



**Fátima Luzia Carvalho de Sousa**    **Valorização de subprodutos industriais através da produção de AOVs**



**Fátima Luzia Carvalho  
de Sousa**

**Valorização de subprodutos industriais através da  
produção de AOVs**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Luísa Seuanes Serafim, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Dmitry Evtyugin Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

**presidente**

**Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**  
investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

**Doutor Paulo Alexandre da Costa Lemos**  
investigador auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa

**Prof. Doutor Dmitry Victorovitch Evtugin**  
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal**  
professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## palavras-chave

Digestão anaeróbia, fermentação acidogénica, culturas mistas, ácidos orgânicos voláteis (AOVs), supressão metanogénica, alta pressão hidrostática, steam explosion, HSSL, bambu, engaço uva.

## resumo

O objectivo deste trabalho consistiu na avaliação de diferentes resíduos industriais, licor de cozimento ao sulfito ácido (HSSL), engaço de uva, e bambu da fitorremediação como substratos para processos de digestão anaeróbia (DA) conducentes à produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs). Estes AOVs podem funcionar como precursores de produtos com alto valor acrescentado, como bioplásticos, solventes químicos ou energia, substituindo os compostos de origem petroquímica.

Nos ensaios com HSSL estudaram-se parâmetros como a concentração de inóculo e a carga orgânica, verificando-se um aumento superior a 100% da quantidade de AOVs formados quando se aumentou a carga orgânica de 30 para 60 gCQO/L. Houve a formação de vários ácidos maioritariamente o acético. A supressão da metanogénese com inibidores específicos como bromoetanosulfonato (BES) e não específicos como a alta pressão hidrostática (APH) e a temperatura, também foi estudada no HSSL verificando-se um aumento dos AOVs totais formados de 50% (maioritariamente ácido acético e n-butírico) e 30% (principalmente ácido n-butírico) numa inibição com BES e APH, respectivamente. Verificou-se ainda que nos ensaios com APH não houve formação de ácido propiónico, indicando uma possível inibição da via metabólica em causa.

Nos ensaios com bambu e engaço de uva, como se tratavam de substratos sólidos recalcitrantes, foi estudada a introdução de um passo de pré-tratamento com steam explosion (SE) com objectivo de aumentar a acessibilidade da celulose e hemicelulose às enzimas hidrolíticas dos microrganismos. Verificou-se que a digestão anaeróbia é possível neste tipo de matéria recalcitrante.

**keywords**

Anaerobic Digestion, acidogenic fermentation, mixed culture, volatile fatty acids (VFAs); metanogenesis suppressed, High Pressure (HP), Steam explosion (SE), HSSL, bamboo, stalks grape.

**abstract**

The main goal of this study was to evaluate different industrial by-products like Hardwood Spent Sulfite Liquor (HSSL), grape stalks and bamboo from phytoremediation as substrate for anaerobic digestion processes (AD), leading to the production of volatile fatty acids (VFAs). These VFAs can act as building blocks in chemical industry replacing compounds of petrochemical origin.

The tests performed with HSSL parameters such as inoculum concentration and substrate concentration were studied and an increasing of 100% on the amount of formed VFAs was observed when the substrate concentration increased from 30 to 60 gCOD/L. In these tests, the main VFA formed was acetic acid.

The metanogenesis suppression with specific (BES) and non specific inhibitors, like High Pressure (HP) and temperature, was also studied using HSSL as substrate. The results showed an increase of 50% in total VFAs formed (acetic and butyric acid in the same proportions) and 30% (mainly acetic acid) with BES and HP, respectively. In test with HP there was no formation of propionic acid. In trials with bamboo and stalks grapes (recalcitrant solid substrates), the introduction of a pre-treatment step with steam explosion (SE) was studied in order to increase the accessibility of cellulose and hemicellulose to the hydrolytic enzymes of microorganisms. It was found that acidification was possible in the substrates tested.

# Índice

---

Índice .....	i
Índice de Tabelas.....	v
Índice de Figuras .....	vi
Abreviaturas.....	vii
<b>Capítulo 1 - Introdução.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Objectivos do trabalho .....</i>	<i>2</i>
<b>Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
<i>2.1 Contextualização .....</i>	<i>3</i>
<i>2.2 Biorrefinaria.....</i>	<i>4</i>
2.2.1 Esquema geral do bioprocessamento .....	6
<i>2.3 Biomassa vegetal.....</i>	<i>6</i>
2.3.1 Produtos de biorrefinaria .....	8
<i>2.4 Resíduos Industriais .....</i>	<i>9</i>
2.4.1 Licor de cozimento ao sulfito ácido .....	10
2.4.2 Bambu.....	12
2.4.3 Engaço de uva .....	14
<i>2.5 Pré-tratamentos de Biomassa .....</i>	<i>15</i>
2.5.1 Tipos de pré-tratamentos.....	15
2.5.2 <i>Steam Explosion</i> .....	16
<i>2.6 Digestão Anaeróbia .....</i>	<i>18</i>
2.6.1 Fundamentos e aplicações .....	18
2.6.2 Étaps da digestão anaeróbia.....	19
2.6.3 Vantagens e factores que influenciam a digestão anaeróbia.....	24
<i>2.7 Acidificação de substratos complexos .....</i>	<i>25</i>
2.7.1 Produção biológica de AOVs.....	26
<b>Capítulo 3 - Materiais e Métodos .....</b>	<b>29</b>

3.1 Microrganismos .....	29
3.2 Matérias-primas utilizadas .....	29
3.2.1 Licor de cozimento ao sulfito - HSSL .....	29
3.2.2 Bambu proveniente da fitorremediação .....	30
3.2.3 Engaço resultante da actividade vinícola .....	31
3.3 Ensaio de acidificação.....	32
3.3.1 Condições de operação .....	32
3.3.2 Composição dos meios nutricionais .....	32
3.3.3 Ensaio efectuado.....	33
3.3.4 Tratamento de inibição da metanogénese .....	34
3.4 Caracterização das matérias-primas .....	35
3.4.1 Determinação do teor de humidade .....	35
3.4.2 Determinação do teor de cinzas .....	35
3.4.3 Determinação do teor de extractáveis.....	35
3.4.4 Determinação de proteínas.....	36
3.4.5 Determinação do teor de lenhina Klason .....	36
3.4.6 Determinação do teor de celulose (Kürschner e Höffer) .....	37
3.4.7 Determinação do teor de hemiceluloses .....	37
3.4.8 Determinação de açúcares .....	37
3.4.9 Determinação conteúdo em metais pesados.....	38
3.5 Métodos analíticos.....	39
3.5.1 pH .....	39
3.5.2 Sólidos .....	39
3.5.3 Carência química de oxigénio.....	39
3.5.4 Determinação AOVs, açúcares e etanol .....	40
3.5.5 Determinação dos Lenhossulfonatos .....	40
3.6 Caracterização das populações microbianas .....	41
3.7 Cálculos .....	42
<b>Capítulo 4 – Resultados e Discussão .....</b>	<b>45</b>
4.1 Caracterização química dos substratos.....	45
4.1.1 HSSL.....	45
4.1.2 Bambu .....	46
4.2 Fermentação acidogénica .....	48

4.2.1 Licor do cozimento ao sulfito.....	48
4.2.2 Ensaio em meio sintético.....	54
4.2.3 Efeito da concentração das lamas .....	55
4.2.4 Efeito da carga orgânica .....	58
4.2.5 Estudo da inibição da Metanogénese.....	61
4.2.6 Bambu proveniente de fitorremediação .....	64
4.2.7 Engaço de uva.....	67
4.3 <i>Caracterização molecular do consórcio microbiano</i> .....	69
<b>Capítulo 5 - Conclusão.....</b>	<b>73</b>
5.1 <i>Trabalho Futuro</i> .....	75
<b>Capítulo 6 -Bibliografia.....</b>	<b>77</b>
<b>Anexos A .....</b>	<b>83</b>
<b>Anexos B .....</b>	<b>84</b>





# Índice de Tabelas

Tabela 1: Tipos de biorrefinarias [8].....	5
Tabela 2: Composição do HSSL [23]. ....	12
Tabela 3: Composição química geral de diferentes espécies de bambu [25] .....	13
Tabela 4: Composição química do engaço [28].....	14
Tabela 5: Composição média em monossacarídeos do engaço [28]. ....	14
Tabela 6: Pressão de inativação de microrganismos [52].....	23
Tabela 7: Uso e aplicação dos vários tipos de ácidos orgânicos voláteis (adaptado [4]). ....	25
Tabela 8: Estudos da produção de VFA, e/ou a sua utilização para produzir produtos de valor acrescentado .....	26
Tabela 9: Condições processo de pré-tratamento do SE aplicadas ao bambu. ....	31
Tabela 10: Condições do processo de pré-tratamento do SE aplicadas ao engaço uva. ....	31
Tabela 11: Meio nutricional usado na fermentação acidogénica das amostras de bambu e engaço de uva (A) e na fermentação acidogénica do HSSL (B). ....	32
Tabela 12: Condições experimentais das baterias de testes elaboradas. ....	33
Tabela 13: Factores de conversão em CQO. ....	42
Tabela 14: Caracterização em CQO total (TCQO) e solúvel (SCQO) das três fracções de HSSL estudadas: .	45
Tabela 15: Composição química do bambu natural e após <i>steam explosion</i> . ....	46
Tabela 16: Análise elementar do conteúdo em metais (mg do elemento por kg de cinza) .....	47
Tabela 17: Composição média em monossacarídeos do bambu com <i>steam explosion</i> . ....	48
Tabela 18 Parâmetros calculados da fermentação acidogénica. ....	50
Tabela 19: Resultados da fermentação acidogénica. ....	57
Tabela 20: Resultados obtidos para as diferentes cargas orgânicas. ....	60
Tabela 21: Resultados obtidos para a inibição metanogénica. ....	63
Tabela 22: Resultados da fermentação com bambu.....	67
Tabela 23: Fermentação acidogénica do engaço de uva.....	68
Tabela 24: Rectas calibração utilizadas como calibração para determinação dos compostos formados....	83
Tabela 25: Oligonucleótidos 16rRNA utilizados como sondas. ....	84

# Índice de Figuras

Figura 1: Conceito de biorrefinaria [7].	4
Figura 2: Fluxograma geral do bioprocessamento de biomassa vegetal [4].	6
Figura 3: Estrutura e principais constituintes da biomassa lenhocelulósica [11].	7
Figura 4: Esquema industrial do processo de produção de pasta de papel usado na Caima [17].	11
Figura 5: Principais opções de processos de hidrólise para a biomassa no contexto de uma biorrefinaria [8].	17
Figura 6: Esquema do processo de digestão anaeróbia [7].	19
Figura 7: Possíveis vias metabólicas da conversão da xilose nos vários AOVs [47].	21
Figura 8: Esquema de valorização do HSSL e identificação das fracções (SSL, SSLq, SSLs) que serviram de substrato às fermentações acidogénicas.	30
Figura 9: Formação de AOV ao longo do tempo de digestão no SSL.	49
Figura 10: Fermentação acidogénica do substrato SSLq.	51
Figura 11: Fermentação acidogénica do substrato SSLs.	52
Figura 12: Fermentação acidogénica do substrato SSL' (sintético).	55
Figura 13: Evolução do processo de digestão anaeróbia do ensaio SSLq 10x.	56
Figura 14: Evolução do processo de digestão anaeróbia do ensaio SSLs 10x.	56
Figura 15: Percentagem de AOVs na fracção de CQO solúvel no final da fermentação nas baterias com 1 e 10 gSSV/L.	58
Figura 16: Resultados dos AOV <sub>T</sub> das várias cargas orgânicas aplicadas.	59
Figura 17: Variação do pH ao longo medido ao longo da fermentação.	59
Figura 18: Efeito dos diferentes tipos de supressores metanogénicos testados na quantidade total de AOVs na fermentação acidogénica da fracção SSLq.	62
Figura 19: Fermentação acidogénica do bambu com SE (B <sub>SE</sub> ).	65
Figura 20: Fermentação acidogénica do bambu com os dois pré-tratamentos (B <sub>NaOH</sub> ).	65
Figura 21: Fermentação acidogénica do engaço ao longo do tempo.	68
Figura 22: Percentagem molar de cada ácido em relação aos ácidos totais formados.	69
Figura 23: Resultados de FISH para as sonda EUBmix (A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> e C <sub>1</sub> ) e para as sondas correspondentes às classes $\alpha$ - e $\gamma$ -proteobactérias (A <sub>2</sub> e B <sub>2</sub> ) e ao género <i>Thauera</i> (C <sub>2</sub> ).	70
Figura 24: Observação mudança de cor das fracções de HSSL no final da fermentação.	83

## Lista de Abreviaturas

$\Delta G^\circ$	Energia livre de Gibbs
AOVs	Ácidos orgânicos voláteis
AOV <sub>T</sub>	Ácidos orgânicos voláteis totais
ATP	Adenosina-trifosfato
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio
CQO	Carência química de oxigênio
DP	Desvio padrão
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
EtOH	Etanol
HAc	Ácido acético
HBut	Ácido n-butírico
HLac	Ácido Láctico
HPr	Ácido propiónico
LS	Lenhossulfonatos
LSIWC	Latvian State Institute of Wood Chemistry
SCP	Single Cell Protein
SCQO	Carência química de oxigênio solúvel
SE	<i>Steam Explosion</i>
SSV	Sólidos suspensos voláteis
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
SVT	Sólidos voláteis totais
TAPPI	Technical association of the pulp and paper industry (Associação técnica da indústria da pasta e do papel)
TCQO	Carência química de oxigênio total
XOS	Xilooligossacarídeos
APH	Alta Pressão Hidrostática
Glc	Glicose
Xly	Xilose



# Capítulo 1 - Introdução

---

Nos últimos tempos os jornais têm sido pródigos em notícias como o aumento nos preços de combustível, referências sobre a crise, problemas ambientais ou catástrofes naturais. Os desenvolvimentos técnicos que conduziram à qualidade de vida das sociedades modernas têm por base os recursos que o planeta oferece. Mas estes recursos de origem fóssil são limitados e a sua utilização tem conduzido a uma série de problemas ambientais como poluição de recursos hídricos, e solos ou alterações climáticas. Por esta razão termos como “sustentabilidade”, “energias renováveis”, “microgeração”, “responsabilidade social” ou “eco-eficiência” passaram a fazer parte do vocabulário nos últimos 50 anos [1]. Num planeta que terá 9 bilhões de pessoas em 2050, considerando o modelo económico actual, os recursos naturais no mundo não serão suficientes para suportar as necessidades energéticas. A procura de soluções para os problemas ecológicos e energéticos tornou-se uma área fundamental de investigação que pretende uma utilização racional dos recursos naturais e a obtenção de novas fontes de energia e matérias-primas.

O trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado enquadra-se na área da Biotecnologia Branca (ou Industrial) e tem como objectivo aproveitar subprodutos industriais com pouco ou mesmo sem qualquer valor económico aplicando um processos biotecnológico, fermentação acidogénica, de forma a obter ácidos orgânicos voláteis (AOVs), que servirão de base à produção de produtos de valor acrescentado como bioplásticos, biocombustíveis e outros compostos produzidos pela indústria química ou de base biotecnológica em desenvolvimento.

Este trabalho inicia-se com a revisão bibliográfica onde se definem os conceitos base e se descreve o estado actual do tema em causa. Em seguida é descrito o esquema de trabalho experimental desenvolvido, assim como os métodos de análise. No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos. As conclusões resultantes da discussão feita são enumeradas no quinto capítulo, seguindo-se sugestões de trabalho futuro e a bibliografia utilizada na elaboração desta tese.

### 1.1 Objectivos do trabalho

Os principais objectivos deste projecto de mestrado foram:

- Valorização de produtos secundários de três actividades industriais diferentes:
  - Licor do cozimento ao sulfito (*Hardwood Spent Sulfite Liquor*-HSSL) da Indústria de pasta de papel;
  - Bambu proveniente da fitorremediação;
  - Engaço da uva da indústria agro-alimentar.
- Desenvolver, otimizar e avaliar os parâmetros de operação como quantidade de inóculo e carga orgânica em sistemas descontínuos no processo de digestão anaeróbia;
- Avaliar a produtividade de AOVs em três fracções do HSSL com e sem pré-tratamento.
- Avaliar o grau de supressão da população metanogénica pela aplicação de diferentes inibidores metanogénicos, como A
- Analisar o efeito do pré- tratamento *Steam explosion* (SE), na matéria lenhocelulósica sólida (bambu e engaço);

Como objectivos secundários pretendeu-se compreender os fenómenos físico-químico-biológicos que originam o tratamento anaeróbio através da identificação dos parâmetros cruciais para a optimização dos processos, assim como eventuais perturbações dos sistemas e as medidas correctas a adoptar no controlo e prevenção da metanogénese. Finalmente pretendeu-se analisar por técnicas da biologia molecular os consórcios microbianos seleccionados pelas diferentes condições operacionais impostas.

# Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

---

## 2.1 Contextualização

Antes da Revolução Industrial a economia global era baseada no que era designado por “carbono vivo”, oriundo das plantas. Actualmente a economia restringe-se praticamente ao carbono inorgânico, petróleo, carvão e gás natural [2]. Esta utilização tem causado desequilíbrios no ciclo do carbono pois da utilização de combustíveis fósseis resulta uma quantidade de CO<sub>2</sub> maior do que aquele que é possível remover naturalmente pelo planeta conduzindo em alterações climáticas[3]. A utilização de biomassa em substituição dos combustíveis permitirá colmatar as necessidades energéticas da sociedade de forma sustentável [4].No entanto é necessário um grande investimento e desenvolvimento processual para a utilização da biomassa como base da indústria química.

Os primeiros produtos de base biológica surgiram há cerca de 30 anos como consequência da crise petrolífera dos anos 70, conduzindo ao aparecimento de uma indústria biotecnológica nova nos anos 80. O sucesso comercial deste tipo de produtos não tem sido o esperado, pois corresponde a um retorno de investimento lento devido à necessidade de desenvolver tecnologia nova. Além disso os produtos petrolíferos ainda dominam os mercados. No entanto esta situação tem mudando nos últimos anos, verificando-se que grandes empresas multinacionais agrícolas como a ADM e a Cargill passaram a utilizar os seus subprodutos para produzir etanol e suplementos alimentares [4].

Em relação a Portugal, um estudo designado “**ViaBio**” realizado pela Cotec, demonstrou que a Biotecnologia Industrial tem potencial como ferramenta ao serviço da inovação empresarial e da competitividade da economia nacional embora ainda existam algumas lacunas que devem ser colmatadas no futuro. Estas lacunas situam-se sobretudo em áreas relacionadas com o ambiente e na relação entre a investigação e a indústria. O mesmo estudo concluiu que o país pode beneficiar com a valorização energética de matérias-primas de baixo valor, um campo de investigação onde a cooperação entre a investigação científica e a indústria tem aumentado nos últimos anos. Além disso, verifica-se uma procura de soluções por parte da indústria para tratar/reutilizar os seus resíduos [5].



### 2.2 Biorrefinaria

A palavra ‘refinar’ significa a purificação e aproveitamento de propriedades específicas de matérias naturais ou produtos resultantes da indústria. As Refinarias Petrolíferas estão na base da obtenção deste tipo de características, surgindo a gasolina, óleos lubrificantes, tintas, fibras como produtos resultantes do petróleo bruto [6]. Na *Biorrefinaria* estes métodos são substituídos por tecnologias mais sustentáveis, químicas ou biológicas, capazes de obter os mesmos produtos ou produtos novos a partir de biomassa convertendo-os em energia, químicos e materiais sem produção exagerada de resíduos (Figura 1). Em comparação com as refinarias tradicionais, as biorrefinarias usam gama mais alargada de matéria-prima e de processos tecnológicos [6]. É ainda importante referir que a biomassa utilizada nas biorrefinarias deverá ser preferencialmente matéria-prima que normalmente não seja destinada à alimentação humana ou animal, como os resíduos e subprodutos urbanos e das indústrias agro-industriais, florestais e marinha [7].

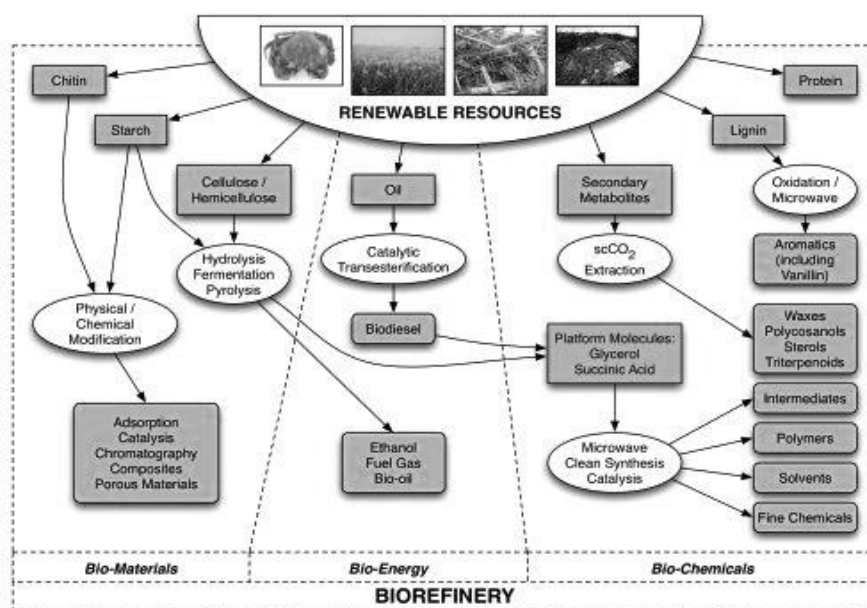


Figura 1: Conceito de biorrefinaria [7].

Dependendo da origem da matéria-prima, das tecnologias de processamento e dos produtos obtidos, podemos classificar as biorrefinarias em quatro tipos: de base bioquímica (açúcares), termoquímica, de biogás ou oleoquímica [7] [8].

Tabela 1: Tipos de biorrefinarias [8].

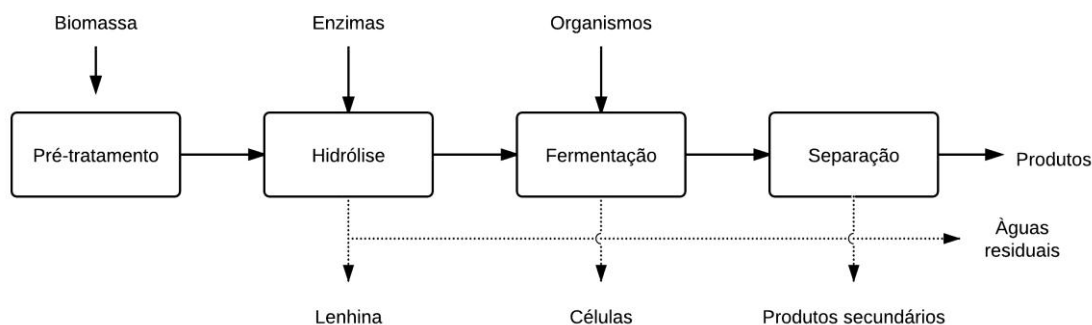
Biorrefinaria de base:	Matéria-Prima	Principais Processos	Produtos
<b>Bioquímica</b>	Biomassa amilácea e lenhocelulósica	Hidrólise química e/ou enzimática, fermentação, bioconversão	Químicos valor acrescentado Percursos químicos Bioetanol Calor e electricidade (lenhina)
<b>Termoquímica</b>	Biomassa lenhocelulósica, plásticos, borracha, etc.	Gasificação e pirólise	Syngas Óleo de pirólise Biocombustíveis (gasosos e líquidos)
<b>Biogás</b>	Efluentes líquidos Estrumes	Digestão anaeróbia	Metano e dióxido de carbono Químicos de valor acrescentado.
<b>Oleoquímica</b>	Óleos de plantas e gorduras animais	Transesterificação	Biodiesel, glicerina e ácidos gordos

Entende-se por biorrefinaria de base bioquímica o uso de hexoses e pentoses provenientes de biomassa amilácea ou lenhocelulósica, é sempre necessário um hidrólise química e/ou enzimática antes da fermentação. A biorrefinaria de base termoquímica, implica um processo de conversão química usando pirólise ou gaseificação de matéria que podem ser plantas lenhocelulósicas, plásticos e borracha obtendo-se como principal produto biocombustíveis. Oleoquímicas é uma biorrefinaria baseada em óleos (compostos ricos em carbono) de onde se obtém biodiesel e glicerol [8, 7].

Recentemente começa a surgir uma nova plataforma baseada no processo de acidificação biológica das matérias-primas, os ácidos orgânicos voláteis (VFAs – *volatile fatty acids*) como produto intermediário para a obtenção dos produtos com interesse económico [7].

### 2.2.1 Esquema geral do bioprocessamento

O bioprocessamento de biomassa envolve várias etapas, desde do pré-tratamento, passando pelo processo de fermentação ou biocatálise, acabando no processo de separação, recuperação e purificação do produto (Figura 2),



**Figura 2: Fluxograma geral do bioprocessamento de biomassa vegetal [4].**

Os vários passos do fluxograma não são estáticos e as operações unitárias escolhidas dependem dos substratos, dos microrganismos e do tipo e aplicação do produto [4].

No presente trabalho as fases de hidrólise e fermentação são realizadas na digestão anaeróbia, uma vez que se trata de um consórcio misto de quatro populações microbianas com diferentes metabolismos: a primeira população hidrolisa a matéria pré-tratada enquanto as restantes três fermentam os substratos resultantes.

## 2.3 Biomassa vegetal

Do ponto de vista energético, biomassa define-se como todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica, tanto vegetal como animal, que pode ser utilizada na produção de energia directamente ou após um processo de conversão [9]. A sua utilização é crescente, visto as reservas petrolíferas serem cada vez mais escassas e estarem localizadas em grande maioria nas regiões de conflitos geopolíticos.

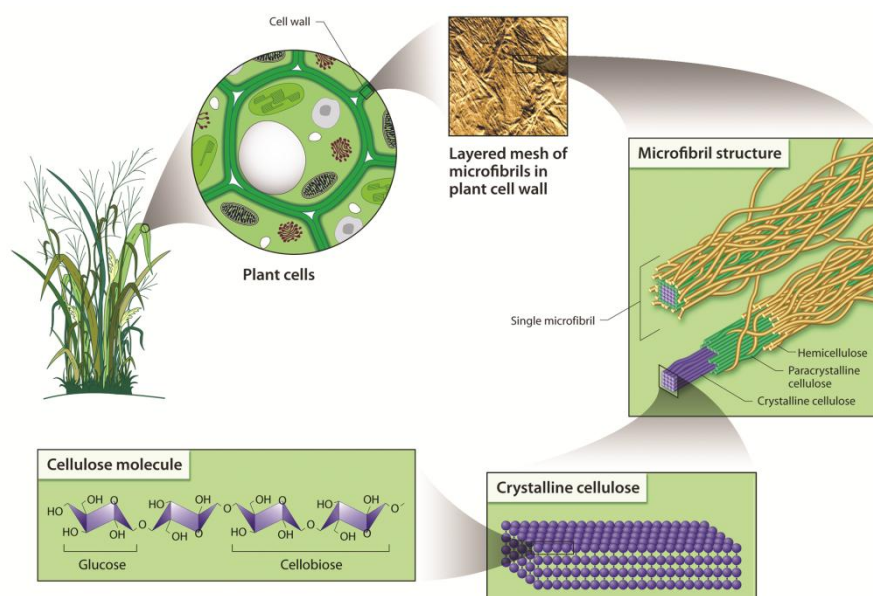
Das possíveis origens de biomassa, a lenhocelulósica é a mais abundante no planeta, com uma produção anual de cerca de  $200 \times 10^9$  toneladas [2]. É ainda de referir que a matéria-prima lenhocelulósica é mais barata do que qualquer outra matéria-prima (petróleo, gás natural, sementes milho e óleo de soja) com base no conteúdo energético (\$/GJ). Enquanto o preço do petróleo varia entre \$40 a \$80 por barril, correspondendo a \$7,1-14,2/GJ, a biomassa

lenhocelulósica custa \$0-3/GJ [2]. Por ser um recurso renovável, abundante e de baixo preço, a utilização de biomassa permite a obtenção de energia e químicos por processos mais sustentáveis. Os Departamentos de Energia e da Agricultura dos EUA prevêem que a biomassa fornecerá, até 2030, 5% da energia (calor e electricidade), 20% dos combustíveis (etanol e biodiesel) e 25% dos produtos industriais, substituindo 30% do consumo actual do petróleo no país [4]. Nos EUA, as culturas ricas em amido são actualmente as principais matérias-primas usadas nas fermentações industriais, pois o amido comparativamente à celulose e à hemicelulose é, mais fácil de degradar em açúcares por métodos enzimáticos ou químicos [4]. No entanto as culturas ricas em amido, normalmente destinam-se à alimentação humana e animal, não sendo viável a sua utilização a nível mundial.

Os resíduos ou subprodutos originários das actividades agro-florestais e industriais têm sido cada vez mais estudados como fonte de biomassa em termos de viabilidade económica do processo de valorização. Em alguns casos estas matérias-primas constituem um problema ambiental pela toxicidade e/ou pelo volume a tratar.

Os materiais lenhocelulósicos são constituídos por três fracções principais: celulose, hemicelulose e lenhina como se apresenta na Figura 3 [10]. A composição da parede celular depende muito do tipo de planta, das condições de cultivo e da idade.

A estrutura lenhocelulósica é resistente tanto à degradação biológica como química, pois a acessibilidade de enzimas ou químicos é baixa devido à estrutura cristalina das fibras de celulose e a camada protectora de lenhina na superfície da celulose [11].



**Figura 3: Estrutura e principais constituintes da biomassa lenhocelulósica [11].**

A **celulose**, constituinte mais abundante da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glucose unidas entre si por ligações glicosídicas ( $\beta(1\rightarrow4)$ ), apresentando um grau de polimerização de até 10.000. A sua estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas, possibilita a formação de ligações de hidrogénio intra e intermoleculares levando agregação das cadeias celulósicas em “fibrilas elementares” com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel num grande número de solventes e, explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana [12].

As **hemiceluloses** localizam-se entre a lignina e sob a rede de celulose. São heteropolissacarídeos de estrutura ramificada e amorfa, apresentam um grau de polimerização inferior a 200 e são constituídas por cinco monossacarídeos: D-glucose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose e pequenas quantidades de L – ramnose, ácido D-glucorónico, ácido 4-O-metil-D-glucorónico e ácido D-galacturónico [12].

A **lignina** é uma macromolécula complexa, formada pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo protecção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose. Enquanto que as paredes celulares de gramíneas apresentam os menores teores de lignina, as de madeiras de coníferas (softwoods) são as mais ricas neste componente. Tanto os açúcares C5 como os fragmentos de lignina podem ser usados como matéria-prima para a produção de produtos químicos numa biorrefinaria. A lignina apresenta baixa solubilidade na maior parte dos solventes [13].

Conforme ilustrado na Figura 3, a íntima associação entre as três fracções principais (celulose, hemicelulose e lignina) constitui uma dificuldade para a utilização dos açúcares monoméricos que as constituem. Por esta razão, nos últimos anos têm surgido vários estudos para o desenvolvimento de pré-tratamentos mais eficientes na desagregação destes compostos [11], descritos com mais detalhe no subcapítulo 2.5.

### 2.3.1 Produtos de biorrefinaria

A produção biotecnológica de químicos causa menos danos ao ambiente que os métodos aplicados nas indústrias convencionais (síntese química), devido a resultarem subprodutos menos tóxicos para o ambiente, mais fáceis de separar e tratar e em muitos casos poderem servir de substrato para outros processos. Actualmente várias indústrias de diversas áreas obtêm ou melhoram os produtos aplicando processos biotecnológicos. Na indústria química já existem desenvolvimentos em multinacionais como as DuPont e a Genencor para obtenção de

propanodiol ou a Metabolix que produz plásticos de alta performance baseados nos polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de material renovável [4].

Um exemplo da aplicação de biorrefinaria alimentar é a digestão anaeróbia de soro de leite (um subproduto da produção de queijos), após a utilização de enzimas imobilizadas para a produção de oligossacarídeos de galactose que têm acção pré-biótica com aplicação em alimentos e rações animais [4]. Existem uma infinidade de resíduos que podem ser estudados e aproveitados para valorização de produtos no processo de biorrefinaria.

As indústrias de energia e combustíveis representam um enorme mercado mundial. A taxa de consumo anual de bioetanol nos EUA é de 530 bilhões de litros enquanto que o Brasil produz cerca de 15 bilhões de litros que satisfazem cerca de 33% das necessidades do país. Existe assim uma necessidade na utilização de outro tipo de recurso renovável para além da biomassa vegetal amilácea, surgindo a matéria lenhocelulósica (o recurso renovável mais abundante do planeta) como forma de colmatar esta carência [2].

Desta forma se demonstraram as oportunidades e potencialidades económicas e ambientais de uma biorrefinaria. Trata-se de uma área que ainda precisa de uma grande componente em I&D de forma a se aproveitar mais resíduos do que os já utilizados.

## 2.4 Resíduos Industriais

A viabilidade económica dos resíduos e subprodutos industriais depende do tipo de transformação aplicada. Existem numerosos tipos de resíduos, muitas vezes poluentes do meio ambiente, que podem ser bioprocessados de forma a originar um produto de valor acrescentado. Dependendo da região e da actividade económica envolvente são vários os tipos de resíduos que se podem obter. No caso específico do presente trabalho experimental utilizaram-se o licor do cozimento ao sulfito ácido (HSSL, *Hardwood Spent Sulfite Liquor*), bambu proveniente de fitorremediação e o engaço da uva para produzir ácidos orgânicos voláteis (AOVs) por digestão anaeróbia.

### 2.4.1 Licor de cozimento ao sulfito ácido

#### 2.4.1.1 Produção industrial de pasta de papel

A indústria papeleira produz anualmente uma grande quantidade de subprodutos ricos em matéria lenhocelulósica, de baixo custo e fácil acesso. Existem essencialmente dois tipos de tratamento químico para obtenção de pasta celulósica: o processo Kraft e o processo de cozimento ao sulfito ácido. No processo Kraft, a madeira é cozida numa solução de hidróxido de sódio e sulfito de sódio. No processo ao sulfito ácido a madeira é cozida numa mistura de ácido sulfuroso e iões de hidrogenossulfato, para dissolver a lenhina. Deste último procedimento resulta um efluente que normalmente é queimado para obtenção de energia [14]. A produção anual de pasta de sulfito branqueada ronda 1 milhão de toneladas por ano, um enorme incremento para a economia de países como África do Sul, Portugal e Espanha [15]. Em Portugal, a indústria de pasta de papel ocupa uma posição relevante no conjunto da indústria transformadora, com uma capacidade de produção anual, de cerca de 1 755 000 toneladas (em 1999). Cerca de 86% é pasta de eucalipto, da qual 75% é exportada. Portugal é o maior produtor europeu neste segmento, produção de pastas branqueadas de eucalipto ao sulfato [16].

#### 2.4.1.2 Processo de cozimento ao sulfito ácido

A indústria papeleira portuguesa utiliza, principalmente, como matéria-prima para a produção de papel, a madeira proveniente das folhosas (hardwood), na sua maioria da espécie *Eucalyptus globulus*. O composto principal usado para a pasta de papel é a celulose, o objectivo principal é libertar as fibras de celulose contidas na lenhina e posteriormente branqueá-las. A madeira é descascada e cortada em aparas que são cozidos numa solução de ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) e de iões bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), durante 4 a 20 horas num intervalo de pH de 1 a 2 a temperaturas de 120 a 135 °C. O ião bissulfito pode ser combinado com cálcio, magnésio, sódio ou amónia [14]. Durante o cozimento a ligação de grupos ácidos sulfónicos à lenhina resulta na solubilização e extracção de grande parte desta. As hemiceluloses são solubilizadas pela quebra das ligações glicosídicas, dando origem a polímeros sucessivamente mais pequenos. Durante o processo de hidrólise forma-se furfural a partir de pentoses enquanto o hidroximetilfurfural resulta das hexoses [14].

Do processamento da pasta resulta o licor do cozimento que passa por um processo de evaporação e reaproveitamento de vários compostos. A fracção utilizada neste trabalho é o licor

ao sulfito ácido (HSSL), também denominado por licor fino que é retirado do evaporador 7 de acordo com o apresentado na Figura 4.

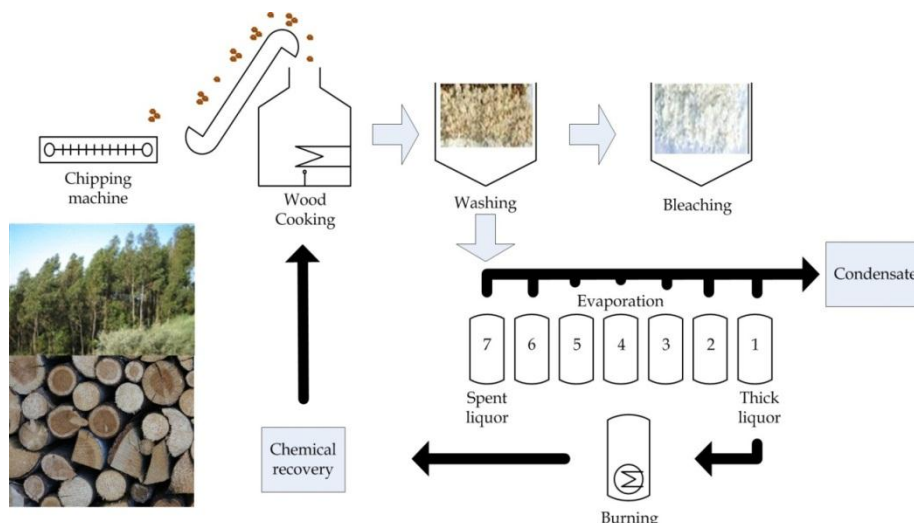


Figura 4: Esquema industrial do processo de produção de pasta de papel usado na Caima [17].

#### 2.4.1.3 Caracterização do HSSL

O HSSL apresenta uma elevada carência bioquímica de oxigénio (CBO), cerca de 2500 a 5000 ppm constituindo um sério problema ambiental [18]. O HSSL utilizado neste trabalho foi fornecido pela CAIMA-Indústria de Celulose SA (Constância, Portugal) e a sua composição apresenta-se na Tabela 2. O HSSL tem sido testado como substrato em vários trabalhos experimentais para a produção de bioetanol celulósico [18, 15], xilitol [19, 20] ou proteína microbiana [15] ou como fonte de compostos de valor acrescentado como a vanilina ou seringaldéido [21, 22].



**Tabela 2: Composição do HSSL [23].**

Componentes:	Concentração (g/L)
Lenhossulfonatos	78,2 ± 0,56
Ácido acético	9,6 ± 0,06
Furfural	vestígios
Cinzas	15,1 ± 0,18
Teor de sólidos	150,3 ± 0,76
Açúcares redutores	44,7 ± 0,02
Xilose	20,5 ± 0,71
Manose	8,5 ± 0,33
Arabinose	7,8 ± 0,21
Galactose	4,5 ± 0,46
Glucose	2,3 ± 0,61
Ramnose	1,6 ± 0,42
Fucose	0,4 ± 0,27
pH	3,4 ± 0,05

O HSSL sendo um resíduo de origem lenhocelulósica antes de ser bioprocessado necessita de pré-tratamento para remover possíveis compostos tóxicos que podem inibir a actividade dos microrganismos, tais como LS de baixo peso molecular, furfurais e polifenóis [24]. Existem vários tipos de pré-tratamento que dependem do tipo de microrganismo e do produto final desejado [15]. Desta forma o HSSL pode ser convertido a açúcares redutores (principalmente xilose), havendo uma grande potencialidade de transformação por aplicação de um bioprocessamento em produto de valor acrescentado.

### 2.4.2 Bambu

#### 2.4.2.1 Bambu e a fitorremediação

O bambu pertence à família das gramíneas (*Andropogoneae/Poacea*) e à subfamília *Bambusoideae*, sendo uma planta com valor económico e ecológico expressivo [25].

Esta gramínea é uma planta usada na fitorremediação de solos e água. Este tipo de remediação baseia-se na capacidade natural das plantas para absorver, acumular ou metabolizar os contaminantes existentes no solo ou na água, que podem ser introduzidos na cadeia alimentar. Algumas espécies conseguem acumular metais em quantidades bastante superiores às suas necessidades nutricionais. A absorção de poluentes ocorre, a partir das raízes que, posteriormente se acumulam no seu interior. As plantas remediadoras normalmente são selectivas, no caso do bambu este tende a assimilar zinco e cádmio [25].

Em Portugal esta tecnologia é aplicada por uma companhia belga designada COBELGAL, que actua maioritariamente no tratamento de águas residuais urbanas construindo mais de 22 ‘wetlands’ (ETAR de macrófitas) por todo o país.

A proliferação das plantas neste tipo de processos associada a um rápido crescimento resultante da sua utilização na biorremediação resulta em elevadas quantidades de biomassa contaminada. Por esta razão são necessários métodos eficientes e economicamente viáveis para o tratamento desse resíduo. Dentro destes métodos, a conversão desta biomassa lenhocelulósica por degradação anaeróbia é uma opção de estudo [26].

### 2.4.2.2 Composição química do bambu

Os principais constituintes da composição química média dos colmos de bambu são polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e lenhina e, em menor quantidade, resinas, ácido tânico, ceras e sais inorgânicos. A sua composição varia de acordo com a espécie, as condições de crescimento vegetativo, idade e a parte do colmo considerada [21]. A Tabela 3 apresenta a composição química aproximada de algumas espécies de bambu.

**Tabela 3: Composição química geral de diferentes espécies de bambu [25]**

Espécies	Holocelulose	Pentosanas	Lenhina	Extractáveis em etanol-benzeno	Cinzas	Sílica
<i>Gigantochloalevis</i>	62,9%	18,8%	24,2%	3,2%	5,3%	2,8%
<i>Gigantochloaspera</i>	61,3%	19,6%	25,5%	5,4%	4,1%	2,4%
<i>Bambusavulgaris</i>	66,5%	21,1%	26,9%	4,1%	2,4%	1,5%

Para que os materiais poliméricos que compõem os colmos possam ser utilizados por microrganismos é necessário um pré-tratamento inicial.

### 2.4.3 Engaço de uva

O engaço de uva, resíduo da actividade vinícola foi classificado como um dos 10 subprodutos que podem beneficiar de investimento em actividades I&D, um estudo a cargo do Laboratório Nacional de Energias e Geologia (LNEG) sobre os ‘subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica’ [27]. A composição química do engaço apresenta-se na Tabela 4.

**Tabela 4: Composição química do engaço [28].**

Composição	Percentagem (%)
Humidade	20,7
Cinzas	7
Extractáveis	
Acetonas	2,3
Diclorometano	1,0
Água quente	23,7
Celulose Kürschner - Höffer	30,3
Proteínas <sup>a</sup>	6,1
Taninos <sup>b</sup>	15,9
Lenhina Klason <sup>c</sup>	17,4
Hemicelulose	21,0

<sup>a</sup> corrigido para o teor de extractáveis   <sup>b</sup> corrigido para o teor de extractáveis e proteínas   <sup>c</sup> corrigido para o teor de extractáveis, proteínas e taninos

O engaço contém uma percentagem de celulose e hemicelulose elevadas, 30 e 21%, respectivamente, mostrando ser uma boa fonte de monossacáridos após o pré-tratamento adequado. A composição em monossacáridos do engaço apresenta-se na Tabela 5, verificando-se uma maior percentagem de xilose e glucose.

**Tabela 5: Composição média em monossacaridos do engaço [28].**

Monossacaridos	%( $m_{\text{monossacaridos}}/m_{\text{total monossacaridos}}$ )
Ramnose	1,7
Fucose	<0,2
Arabinose	5,5
Xilose	20
Manose	4,8
Galactose	4,9
Glucose	63

A composição do engaço mostra que não é um resíduo perigoso e tem potencial para servir de substrato para processos biológicos como a acidificação por culturas mistas.

## 2.5 Pré-tratamentos de Biomassa

### 2.5.1 Tipos de pré-tratamentos

O pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica é um passo muito importante num bioprocessamento, pois muitas matérias-primas não têm os açúcares na sua forma mais simples para poderem ser utilizados pelos microrganismos. É necessária a hidrólise do material lenhocelulósico de forma a tornar mais disponíveis os monossacáridos presentes na celulose e hemicelulose. Além disso, o pré-tratamento permite remover impurezas, reduzir o tamanho dos resíduos, ou regularizar o teor de nutrientes como lípidos, proteínas e hidratos de carbono da matéria bruta [11].

Alguns pré-tratamentos combinam princípios físicos e químicos representando as melhores opções para fraccionar a biomassa lenhocelulósica. Por norma conjuga-se mais do que um tipo de pré-tratamento, sendo que o adequado deverá idealmente [29, 11]:

1. Maximizar a digestibilidade enzimática;
2. Minimizar a perda de açúcares;
3. Optimizar a produção de subprodutos (lenhina, por exemplo);
4. Não requerer a adição de reagentes que venham a inibir as enzimas hidrolíticas e os microrganismos fermentativos;
5. Minimizar o uso de energia, reagentes e equipamentos;
6. Permitir a transposição para escala industrial.

Os pré-tratamentos da biomassa lenhocelulósica podem ser divididos em pré-tratamentos biológicos (utilização de fungos e enzimas), químicos (aplicação de tratamentos alcalino, ácido, líquidos iónicos), métodos físicos (extorsão) ou métodos físico-químicos (*steam explosion*, ultra-sons, explosão em CO<sub>2</sub>) [9].

No tratamento biológico, utilizam-se essencialmente, fungos xilófagos. Este tipo de tratamento permite a sacarificação da biomassa lenhocelulósica (pelas enzimas hidrolíticas) e remover inibidores como compostos fenólicos [30].

Os métodos de tratamento químico são os processos mais aplicados e referenciados na literatura, principalmente a hidrólise ácida (diluída e concentrada) e o tratamento alcalino.

### *a) Hidrólise Ácida*

A hidrólise ácida é o pré-tratamento mais antigo. O uso de ácidos concentrados a baixas temperaturas é um processo caro com alguns problemas de operação. Este processo degrada maioritariamente a celulose e a hemicelulose resultando uma fase sólida rica em lenhina e uma fase líquida rica em celulose e hemicelulose. A nível industrial normalmente utiliza-se ácido diluído a altas temperaturas, pois permite um rendimento razoável em açúcares a partir da hemicelulose. O  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é o ácido mais usado embora em alguns processos utilizem  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ , e  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Em relação ao ácido concentrado, a utilização de ácidos diluídos causa menos degradação dos produtos e menos problemas de corrosão nos equipamentos [8]. Em alguns casos utilizam-se outros ácidos inorgânicos fracos como o maleico, como catalisadores de hidrólise da celulose [8].

### *b) Hidrólise alcalina*

Os pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e podem utilizar hidróxidos de sódio, cálcio e potássio ou amónia. Ao contrário dos tratamentos ácidos, os alcalinos são mais eficazes na solubilização da lenhina exibindo pequena solubilização no teor de celulose e hemicelulose [8]. O hidróxido de sódio é uma das bases mais utilizadas, em contacto com a matéria-prima, provoca o inchaço da fase sólida, aumentando a área interna superficial. O decréscimo nos graus de polimerização e de cristalização ocorre com a separação das ligações estruturais entre a lenhina e os carboidratos. A disrupção da lenhina aumenta a porosidade do material, permitindo uma maior acessibilidade das enzimas à hemicelulose e celulose. As vantagens deste método são as baixas temperaturas e pressão utilizadas, o baixo custo dos sais alcalinos e a segurança em relação à hidrólise ácida [8, 31].

Outro tipo de tratamento são os físico-químicos, desta gama de processos os mais usados são os hidrotérmicos (processos que usam água e/ou vapor a altas temperaturas). Estes começaram a ser usados antes das hidrólises enzimáticas, onde se incluem tratamentos como a autohidrólise e o *steam explosion*.

### **2.5.2 Steam Explosion**

O *steam explosion* (SE) faz parte da variada gama de métodos físico-químicos e a primeira aplicação descrita na literatura, refere a sua utilização em madeira de pinho em 1980 [8]. Neste processo, o material é aquecido usando vapor de água a alta pressão (20-50 bar, 210-290°C) por um curto período de tempo, durante o qual o vapor de água penetra no material. O condensado de vapor é obrigado a passar por um orifício mais pequeno e como resultado da diferença de

pressão ocorre a explosão da matéria. Desta explosão resulta na desagregação da matriz lenhocelulósica, quebrando ligações intra e intermoleculares [8]. O SE é um dos métodos mais utilizados para degradação deste tipo de biomassa, pois comparativamente aos métodos térmicos, alcalino e ácido exibe uma melhor relação custo/efeito. O SE tem sido extensivamente usado como pré-tratamento na produção de biogás nos resíduos celulósicos [11].

Para além dos pré-tratamentos descritos, existem outros métodos que podem ser aplicados e combinados. É importante referir que os métodos devem ser escolhidos tendo em consideração o objectivo do trabalho. Na Figura 5 encontra-se um esquema que resume os principais tipos de pré-tratamentos aplicados em biorrefinaria e os seus efeitos no material lenhocelulósico.

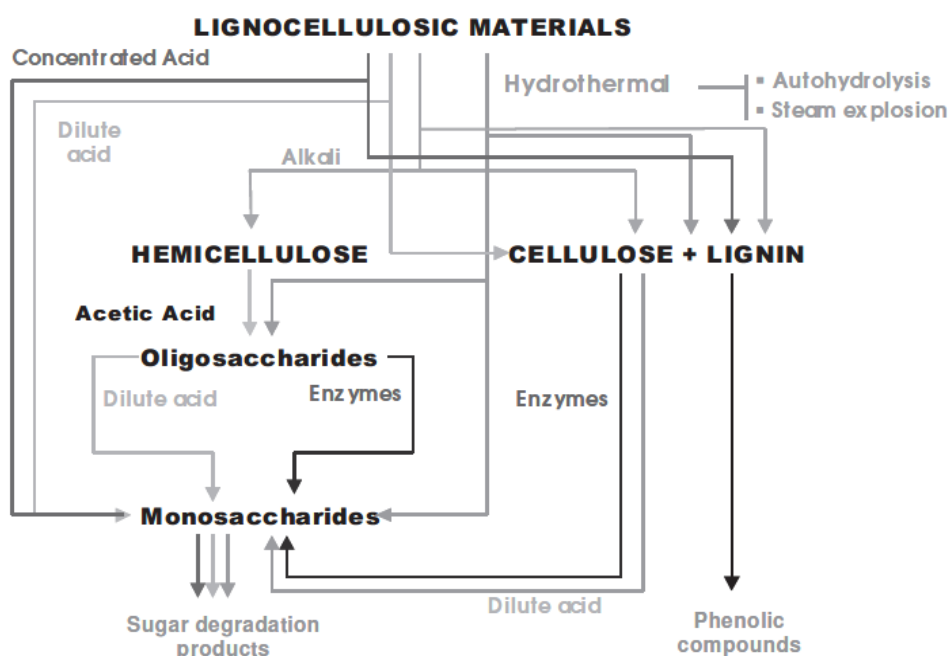


Figura 5: Principais opções de processos de hidrólise para a biomassa no contexto de uma biorrefinaria [8].

## 2.6 Digestão Anaeróbia

### 2.6.1 Fundamentos e aplicações

A digestão anaeróbia (DA) é um processo biológico que ocorre na ausência de oxigénio no qual a matéria orgânica tem como resultado final metano e dióxido de carbono. É um processo microbiológico complexo, onde vários microrganismos formam um consórcio sinérgico [32].

A complexa interacção bioquímica do processo levou a uma incompreensão deste tipo de digestão durante vários anos. Actualmente esta tecnologia encontra-se em franco desenvolvimento um pouco por toda a Europa, em parte devido às exigências ambientais legalmente impostas pela EU. É das poucas tecnologias que simultaneamente produz biogás (como bioenergia) a partir de resíduos de biomassa e reduz a poluição ambiental. A DA é conhecida e utilizada desde há muito tempo no tratamento de lamas de ETAR, e estrumes da agricultura [33]. Nos dias de hoje, a sua acção inclui o tratamento de substratos tão complexos como a fracção biodegradável de resíduos sólidos urbanos (RSU), águas residuais industriais ou resíduos agro-florestais e industriais biodegradáveis.

A DA tornou-se um bioprocesso com diversas aplicações, começou por ser usado para o tratamento de efluentes [34] (remoção de matéria orgânica) e estabilização ou sanitização de resíduos [35]. Actualmente e devido à escassez dos combustíveis, a DA é cada vez mais estudada para a maximizar a produção de biogás [36] e hidrogénio (*dark fermentation*) [37, 38]. A produção de AOVs é outro dos produtos resultante da DA que tem servido de tema a vários estudos pelas suas potencialidades como precursores químicos [39-42].

A microbiologia e a bioquímica do processo de degradação anaeróbia é mais complexa comparativamente ao aeróbio como consequência da maior diversidade de caminhos metabólicos disponíveis para a comunidade anaeróbia. A produção de metano e dióxido de carbono resultante da degradação anaeróbia da matéria orgânica envolve uma cadeia sequencial de percursos metabólicos e a acção combinada e coordenada de diferentes grupos tróficos de bactérias anaeróbias [32]. As bactérias intervenientes no processo de digestão anaeróbia diferem consideravelmente umas das outras em termos de necessidades nutricionais, tolerância a valores distintos de pH e apresentam fisiologias, taxas de crescimento, cinéticas reaccionais e respostas a condições ambientais adversas e distintas [43].

## 2.6.2 Étapas da digestão anaeróbia

O processo de digestão anaeróbia envolve várias populações de microrganismos as quais interagem de forma equilibrada e coordenada e divide-se em quatro passos principais: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese [32], as quais se encontram representadas na Figura 6.

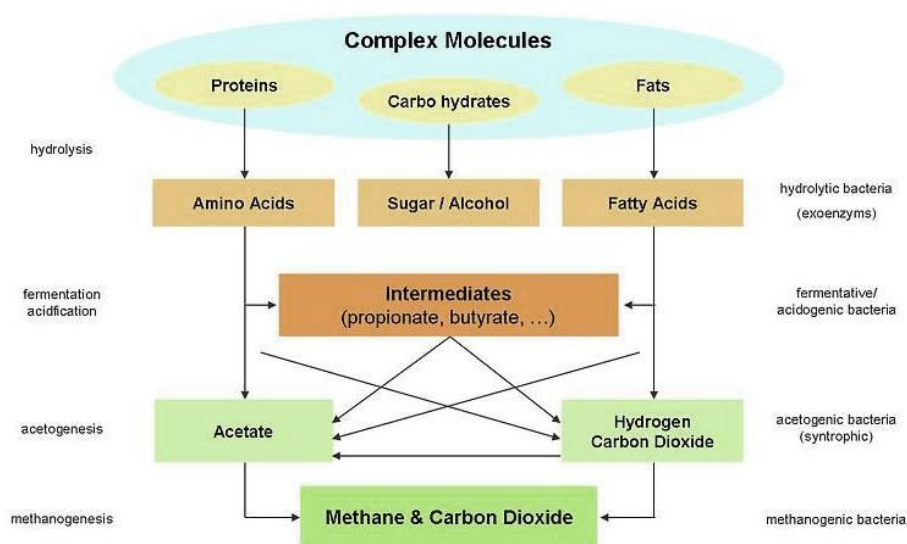


Figura 6: Esquema do processo de digestão anaeróbia [7]

### 2.6.2.1 Hidrólise

A grande maioria dos resíduos é constituída por macromoléculas (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) que *à priori* não conseguem ser utilizadas pelas bactérias fermentativas. Esta fase consiste na conversão das moléculas complexas nos seus monómeros (aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos gordos de cadeia longa e glicerina), podendo estes componentes ser transportados para o interior das células e submetidos a metabolização [32]. Nesta primeira etapa fazem parte da população microbiana, as bactérias fermentativas primárias que normalmente pertencem às famílias das *Streptococcaceae* e *Enterobacteriaceae* [44]. Alguns autores referem a existência de outros microrganismos, como alguns protozoários flagelados e fungos, capazes de produzir enzimas importantes na quebra de ligações moleculares de compostos de lenhina e celulose. A solubilização de compostos insolúveis, tais como lenhina e material celulósico, constitui um dos passos limitantes do processo de digestão anaeróbia, devido às necessidades energéticas elevadas dos microrganismos envolvidos [45]. É de referir que existem fracções na



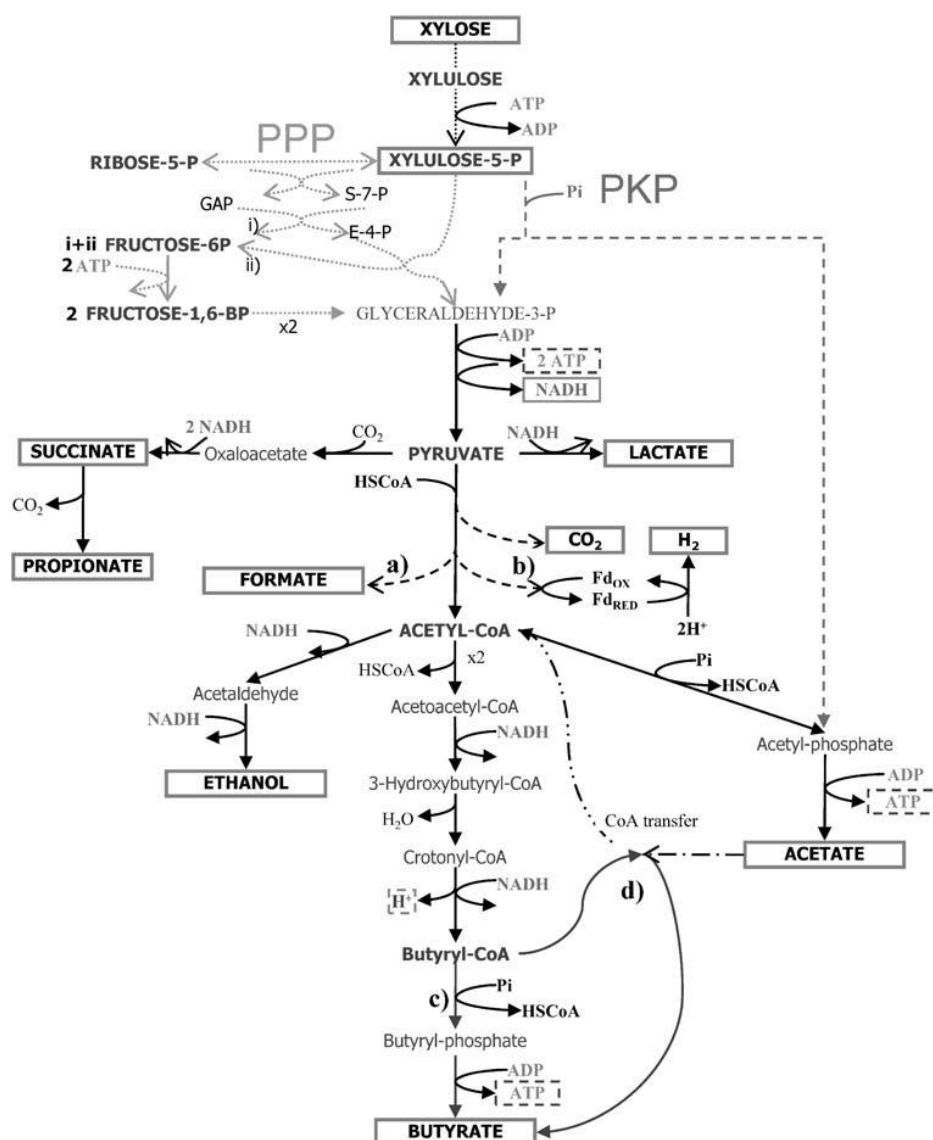
matéria particulada e/ou solúvel as quais não podem ser degradada pois, nem toda a matéria orgânica é biodegradável [32].

### 2.6.2.2 Acidogénese

Depois da hidrólise, os monómeros obtidos são metabolizados por bactérias fermentativas formando compostos intermediários tais como os ácidos fórmico, acético, propiónico, n-butírico, valérico, láctico, etanol e gases como o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . As bactérias fermentativas são maioritariamente anaeróbias obrigatórias, no entanto, algumas são facultativas e podem metabolizar a matéria orgânica por via oxidativa [46]. Nesta fase participam microrganismos pertencentes aos géneros *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. A etapa acidogénica apresenta um balanço energético favorável, com  $\Delta G'^{\circ} < 0$ , ou seja as reacções que ocorrem são termodinamicamente favoráveis nas condições impostas. Desta forma a população acidogénica apresenta reduzidos tempos de duplicação (~30 minutos) e as mais elevadas taxas de crescimento do processo [46], e portanto nunca será o passo limitante.

Em condições anaeróbias os microrganismos acidogénicos não dispõem de um aceitador de electrões, o substrato orgânico é utilizado tanto como dador e receptor desses electrões. Nos processos aeróbios este processo decorre através da transferência dos electrões do NADH para o oxigénio, conduzindo à formação de água, nos microrganismos anaeróbios fermentativos os electrões transferem-se do NADH para o piruvato, formando os vários ácidos orgânicos voláteis [46].

Grande parte dos substratos complexos utilizados são monómeros resultantes da biomassa lenhocelulósica principalmente a xilose e glucose. A Figura 7 representa o esquema das vias metabólicas adaptado com as mais importantes e expectáveis vias metabólicas durante a fermentação anaeróbia da xilose em culturas mistas. As reacções indicadas com (a), (b), (c) e (d) são alternativas de vias metabólicas para o mesmo produto dependendo maioritariamente do tipo de microorganismo.



**Figura 7: Possíveis vias metabólicas da conversão da xilose nos vários AOVs [47].**

### 2.6.2.3 Acetogénese

A acetogénese é fase onde os produtos da acidogénese são metabolizados por bactérias homoacetogénicas e bactérias sintróficas (obrigatórias de hidrogénio). Os  $H_2$ ,  $CO_2$  e alguns açúcares servem agora de substrato às bactérias homoacetogénicas, que produzem ácido acético. Esta etapa só é energeticamente favorável quando a concentração de hidrogénio é de  $10^{-4}$  atm ou inferior. Este hidrogénio pode resultar tanto da acidogénese como da fermentação homoacetogénica e só ocorre na presença de microrganismos que o possam consumir, pois só desta forma a acetogénese é termodinamicamente favorável [32].

### 2.6.2.4 Metanogénese

A metanogénese é a última etapa do processo fermentativo e tem como substrato os produtos intermediários das fases anaeróbias anteriores, como o ácido acético, o metanol, metilaminas e hidrogénio (compostos com baixo número de átomos de carbono). Este passo é realizado pelas bactérias metanogénicas (reino da Archaea), e é onde se forma o biogás que contém em média 50 a 70% de metano, 30 a 40% de CO<sub>2</sub> e uma pequena fracção de H<sub>2</sub>S que pode variar entre 200 a 4000 ppm. As arquea têm normalmente um crescimento lento com um tempo de duplicação de 2 a 3 dias [32].

No presente trabalho pretende-se suprimir a metanogénese de modo a obter AOVs. Este processo designa-se por *dark fermentation*, e desenvolveu-se com o objectivo de produzir H<sub>2</sub> em vez de metano [42].

#### a) Inibição da Metanogénese

A inibição da metanogénese pode ser classificada em específica e não específica. No primeiro caso implica a utilização de substâncias que afectam moléculas específicas das células metanogénicas e, no segundo caso, inibidores que afectam as funções gerais dos microrganismos [48].

Como inibidores específicos são utilizados o bromoetanosulfonato (BES), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), a lumazina e fluoroacetato. No que diz respeito aos inibidores não específicos utilizam-se por exemplo o tratamento térmico, o pH e o acetileno.

A escolha do inibidor deve ter em conta o custo e ainda a possibilidade de resultarem resíduos tóxicos do processo, por isso não se podem utilizar inibidores específicos em grande quantidade. Normalmente utilizam-se inibidores com o acetileno ou faz-se tratamento térmico [37, 42], pois além do baixo custo não têm a desvantagem de deixar resíduos tóxicos na biomassa. Além disso os inibidores específicos podem afectar outras populações de bactérias para além das metanogénicas [48].

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito dos seguintes processos de inibição:

#### •Bromoetanosulfonato

Bromoetanosulfonato (BES) é um análogo estrutural da coenzima M que se encontra em todas os microrganismos metanogénicos, e quase ausentes nas outras bactérias. Por norma usam-se concentrações deste composto à volta de 50mM [48].

### •Temperatura

O tratamento térmico consiste em tratar o inóculo com temperaturas elevadas durante um determinado tempo. A temperatura por norma ronda os 104°C, com tempos que variam das 2 horas [49] a apenas 15 minutos [50]. Quando se aplica este tratamento estão a seleccionar-se bactérias capazes de esporolar eliminando as que não têm essa capacidade, como as metanoarqueas.

### •Alta Pressão Hidrostática (APH)

Não existem ainda na literatura estudos sobre a aplicação deste método para a supressão de arqueas metanogénicas. O processamento por APH consiste em submeter o produto a um intervalo de pressão hidrostática entre 100 e 1000 MPa. Ao longo do processo ocorrem várias mudanças morfológicas nos microrganismos, como a compressão de vacúolos gasosos, o alongamento da célula, a separação da membrana da parede celular, a contracção da parede celular com formação de poros, modificações no citoplasma, modificações de proteínas citoplasmáticas ou a libertação de constituintes intracelulares para o meio extracelular. Estas modificações celulares podem contribuir para a inibição de determinados microrganismos [51]. Os parâmetros operacionais deste processo variam conforme o nível, o tempo e a temperatura de pressurização, tipo e fase de crescimento do microrganismo e a composição do meio. As bactérias Gram positivas são mais resistentes aos efeitos da APH do que as Gram negativas [51]. Células bacterianas vegetativas podem ser inactivadas com pressões de 400 e 600 MPa, enquanto os esporos podem suportar até 1000 MPa à temperatura ambiente (Tabela 6), o que pode indicar uma maior susceptibilidade das bactérias metanogénicas à pressão por não possuírem forma esporolada, tal como se verifica no tratamento térmico.

**Tabela 6: Pressão de inactivação de microrganismos [52].**

Microorganismo	Pressão (MPa)
Bactérias Gram-negativas	300
Bactérias Gram-positivas (não esporoladas)	400-600
Leveduras e fungos	400
Esporo de bactérias Gram-positivas	700-900
Esporos de fungos termorresistentes	900

### 2.6.3 Vantagens e factores que influenciam a digestão anaeróbia

A DA permite tratar resíduos e gerar energias renováveis tornando possível valorizar os desperdícios através de critérios de sustentabilidade e auto-suficiência energética. No entanto, e como qualquer outra tecnologia possui vantagens e desvantagens, relativamente aos sistemas aeróbios [33], e fermentações com culturas puras. As vantagens prendem-se com a baixa produção de biomassa por unidade de matéria orgânica removida; possui baixa necessidade de nutrientes inorgânicos; não necessita de arejamento; tem elevada resistência a choques de carga; capacidade para degradar compostos recalcitrantes e xenobióticos e converte não só carboidratos mas também proteínas e lípidos.

Diversos factores afectam o processo de digestão anaeróbia, como por exemplo a concentração e tipo de substrato, as características do reator ou as condições de operação. Por esta razão é extremamente importante monitorizar e controlar o reator, para que se obtenha um melhor rendimento dos produtos desejados. Os parâmetros a monitorizar são os seguintes [46]:

**-Carência química de oxigénio (CQO):** quantidade de matéria orgânica susceptível de ser oxidada por oxidação química através de oxidantes fortes (mg O<sub>2</sub>/l).

**-Sólidos suspensos voláteis (SSV):** relaciona-se com a concentração de microrganismos presentes no reator.

**-Hidrogénio produzido:** permite verificar a ocorrer degradação de alguns compostos intermediários pelas espécies sintróficas. A acumulação deste gás causa inibição por produto, afectando as reacções de acetogénese [46].

**-pH:** normalmente na gama de 6,5-7,5 para a obtenção de metano, baixando para 5,5-6 para os ácidos orgânicos voláteis [35, 36]. Bengtsson e al (2008) sugerem que o aumento de pH 5 para 6 leva a um consequente aumento de ácido propiónico [37].

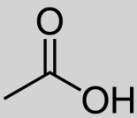
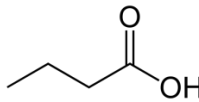
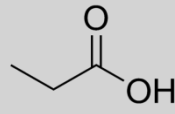
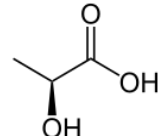
**Temperatura:** Vários estudos têm sido realizados para avaliação da temperatura no processo de digestão anaeróbia, mas centralizados na metanogénese. O efeito da temperatura na acidogénese foi estudado por Wang et al (2006) e verificaram que os processos termófilos possibilitavam uma maior taxa de ácidos. Já Yu et al (2002) e Alexiou e Anderson (2001) concluíram que o aumento de temperatura não melhorava o grau de acidificação. A temperatura mesófila tem sido adaptada nos sistemas de tratamento por DA devido ao seu desempenho operacional [53]. Enquanto a temperatura termofílica permite a destruição de microrganismos patogénicos, e diminui a população do consórcio favorecendo os microorganismos termorresistentes como por exemplo actinomicetos e bactérias da espécie *Bacillus* [54].

**AOVs formados:** Os AOVs diminuem o pH causando problemas no processo tradicional. Segundo Aquino e Chernicharo (2005) os produtos acidogênicos inibem os microrganismos sintróficos levando a uma acumulação contínua de AOVs. Além disso, em condições de choques de cargas orgânicas produzem-se formas mais reduzidas destes ácidos orgânicos (ácido propiónico e ácido butírico)[46].

## 2.7 Acidificação de substratos complexos

Actualmente, os AOVs são produzidos por síntese química usando o petróleo como matéria-prima ou por fermentação a partir de carboidratos. Em termos de mercado global, a síntese química prevalece como opção de comercialização, exceptuando ácidos como o cítrico ou o glucónico cuja principal fonte de produção continua a ser a fermentação. Os AOVs têm inúmeras aplicações que vão desde da Indústria Química, Cosmética e Indústria Alimentar de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7: Uso e aplicação dos vários tipos de ácidos orgânicos voláteis (adaptado [4]).**

	Ácidos orgânicos	Volume mercado (ton/ano)	Produção industrial	Uso/ aplicação
	Ácido Acético	3.500.000	Síntese química; fermentações	Produção de químicos
	Ácido Butírico	30.000	Oxidação química do butiraldeído	Produção de químicos, aromas, produtos farmacêuticos
	Ácido Propiónico	180.000	Síntese química; algumas fermentações	Químicos específicos; conservantes alimentares
	Acido Láctico	400.000	Fermentação Láctica	Produtos alimentares e plásticos

Os AOVs têm ganho importância com a progressão da investigação nesta área. Actualmente, além das biorrefinarias de plataforma de açúcares, termoquímicas (syngas), de lípidos ou biogás, Chang e Kim, (2010) sugerem pela primeira vez o termo biorrefinaria de

plataformas de AOVs. Neste tipo de biorrefinaria, os AOVs funcionam como precursores para a produção de inúmeros produtos de valor acrescentado.

### 2.7.1 Produção biológica de AOVs

Na Tabela 8 apresentam-se estudos que utilizam DA para a obtenção de AOVs a partir de substratos complexos e a sua utilização na produção de produtos de valor acrescentado.

**Tabela 8: Estudos da produção de VFA, e/ou a sua utilização para produzir produtos de valor acrescentado**

<i>Substrato</i>	<i>Produto</i>	<i>Referência</i>
Soro leite	VFA	[41]
Águas residuais industriais		
Estrume de gado	VFA	[42]
Celulose/Hemicelulose		
Resíduos municipais	VFA	[39]
Melaço da cana-de-açúcar	PHAs	[40]
	(polihidroxialcanoatos)	
Efluente do óleo de oliveira	Polímeros biodegradáveis	[55]
Flores Mahua	PHAs	[56]
Melaço da cana-de-açúcar	PHAs	[57]
Águas residuais industriam	PHAs	[58]
papeleira		
Efluente óleo de oliveira	PHA	[59]
Plantas de fitorremediação	Biogás	[38]
Restolhos	Hidrogénio	[37]
Ipomoa ( <i>Ipomoeacarnea</i> )	Gás rico em Metano	[36]

A utilização de biomassa lenhocelulósica para a produção de AOVs é atractiva pelo facto de não competir com matérias-primas destinadas à alimentação. Comparando as vantagens e desvantagens da biorrefinaria de açúcares com uma baseada em AOVs verifica-se que nesta última existe uma fácil aplicação da maior parte da biomassa, a co-produção de H<sub>2</sub>, e não necessita adição de enzimas, nem condições em assepsia. Nas plataformas de açúcares conseguem-se altos rendimentos; e é necessário pouca energia, no entanto é necessário o uso de enzimas que leva a alto custo do tratamento. Este tipo de biorrefinaria é usada em indústrias

como Arkenol, Iogen, Celunol. A biorrefinaria baseada em AOVs está ainda ligada à investigação sendo produzidas em institutos como Terrabon, ZeaChem, Kaist.

Outra vantagem da produção de AOVs por DA em relação a outras plataformas é a possibilidade de usar outros substratos para além dos açúcares, como lípidos e proteínas maximizando as potencialidades do uso de qualquer substrato. Apesar das vantagens, uma biorrefinaria baseada em AOVs ainda não é economicamente viável. No entanto, segundo estimativa realizada para 2030 o custo de produção de etanol a partir de AOVs de biomassa lenhocelulósica pode ser tão competitivo como a produção do mesmo a partir de matérias-primas que contenham açúcares mais simples [7].

Em suma, existe uma mudança de paradigma na forma como se consideravam os AOVs, se anteriormente a digestão anaeróbia só tinha como finalidade tratamento de efluentes indústrias e produção de biogás evitando a produção de AOVs. Actualmente a maximização da produção destes ácidos por fermentações acidogénicas é cada vez mais estudada devido às potencialidades destes precursores químicos.

Por todas as razões mencionadas ao longo deste capítulo, o objectivo deste estudo será analisar pela primeira vez a potencialidade de três resíduos, o HSSL, o engaço de uva e bambu da fitorremediação para a obtenção de AOVs por acidificação.





# Capítulo 3 - Materiais e Métodos

---

## 3.1 Microrganismos

O consórcio de lamas metanogénicas foi obtido na SIMRIA (ETAR Aveiro Sul), num digestor anaeróbio mesófilico convencional para digerir lamas activadas excedentárias. Estas foram armazenadas a 4°C e usadas em todas as baterias de acidogénese nos três subprodutos industriais. Utilizou-se ainda um outro tipo de lamas acidogénicas, neste caso adaptadas a soro de leite num MBBR (*Moving Bed Biofilm Reactor*) do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

As lamas eram caracterizadas no início de cada bateria nova determinando-se os sólidos suspensos totais e voláteis (SST/SSV).

## 3.2 Matérias-primas utilizadas

As matérias-primas estudadas neste trabalho foram:

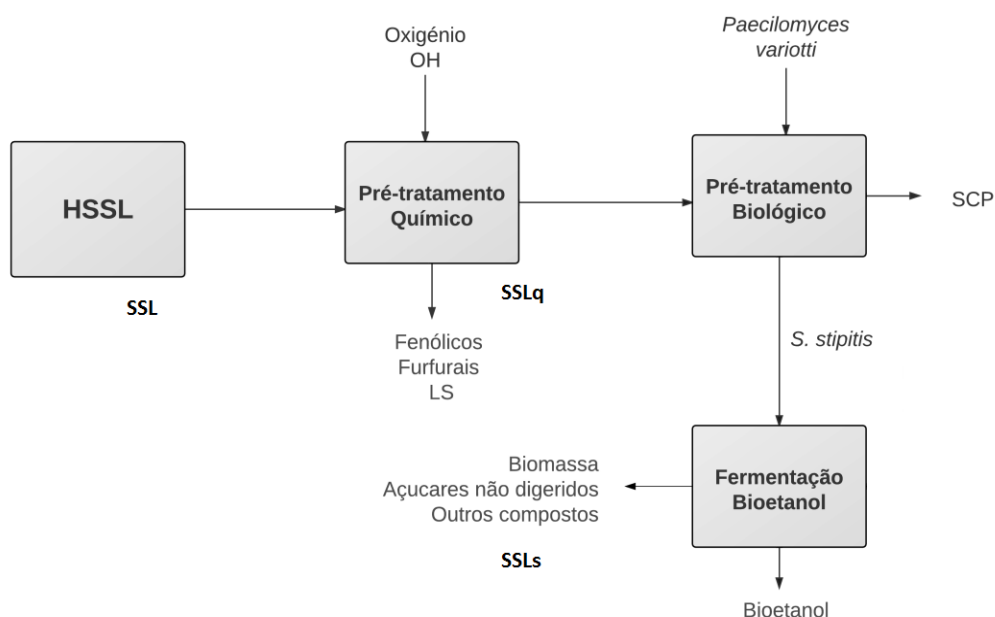
- a) Licor de cozimento ao sulfito;
- b) Bambu proveniente da fitorremediação;
- c) Engaço de uva resultante da actividade vinícola.

A forma como estas matérias-primas foram obtidas e preparadas apresenta-se de seguida.

### 3.2.1 Licor de cozimento ao sulfito - HSSL

Este trabalho experimental inseriu-se num contexto laboratorial onde decorrem projectos orientados para a valorização do HSSL. Dos vários passos do bioprocessamento do HSSL resultam fracções ricas em monossacarídeos e polissacarídeos que foram testadas para acidificação. As fracções utilizadas neste trabalho e a sua recolha no processo de valorização do HSSL encontram-se assinaladas na Figura 8.

- i) HSSL proveniente da Caima S.A. sem nenhum tipo de pré-tratamento (**SSL**)
- ii) Licor resultante do pré-tratamento químico (**SSLq**)
- iii) Licor resultante da fermentação etanólica com *Sheffersomyces stipitis* (**SSLs**)



**Figura 8: Esquema de valorização do HSSL e identificação das frações (SSL, SSLq, SSLs) que serviram de substrato às fermentações acidogénicas.**

As amostras de HSSL sofreram um pré-tratamento químico antes da sua utilização. O primeiro passo deste pré-tratamento consistiu na neutralização do HSSL pela adição de KOH e armazenagem durante 16 horas a 4°C de modo a que precipitassem algumas impurezas. De seguida procedeu-se à oxigenação do licor com ar comprimido durante 2h, para oxidar mais algumas impurezas. Depois deste passo centrifugou-se o HSSL durante 1 hora a 1800 rpm, filtrando-se o sobrenadante a vácuo (filtro com poros de 1 µm), em condições de esterilidade. Por fim, o HSSL tratado foi armazenado esterilmente a 4°C.

A fracção SSLs foi obtida após tratamento biológico do HSSL e subsequente fermentação etanólica dos açúcares presentes por *S. stipitis* segundo a metodologia descrita por Pereira et al. (2012) [15]. Todas as fracções recolhidas foram armazenadas a 4°C numa câmara fria.

### 3.2.2 Bambu proveniente da fitorremediação

As amostras de bambu foram fornecidas pela Cobelgal e conservadas em condições de pouca humidade. Estas distinguem-se de acordo com o pré-tratamento sofrido:

- Bambu pré-tratado com *Steam Explosion* (**B<sub>SE</sub>**)
- Bambu pré-tratado com *Steamexplosion* e NaOH (**B<sub>NaOH</sub>**)

As amostras de bambu foram submetidas a *steam explosion* (SE) no *Laboratory of Biomass Eco-Efficient Conversion* (LSIWC) na Letónia. Como se tratavam de materiais

heterogéneos foi necessária uma homogeneização prévia para diminuir o tamanho das partículas para 1 mm e só depois aplicado o SE. As condições de tratamento para este material apresentam-se na Tabela 9.

**Tabela 9: Condições processo de pré-tratamento do SE aplicadas ao bambu.**

	<i>T</i> (°C)	<i>T</i> (min)	<i>Pressão</i> (bar)	<i>Mistura</i> <i>antes</i> <i>SE(%)</i>	<i>Mistura</i> <i>depois do</i> <i>SE</i>	<i>Ar seco da</i> <i>mistura</i>	<i>logR<sub>0</sub></i>	<i>Rendimento</i> (%)
<b>Bambu</b>	235	1	32	8,5	65,8	8,3(294)	3,97	84,7

A caracterização da severidade do SE usado (chamado de parâmetro de severidade ou  $R_0$ ) pode ser expresso por:

$$R_0 = t \cdot e^{(T-100)/14,75}$$

**Equação 1**

O tempo de tratamento ( $t$ , minutos) e temperatura ( $T$ , °C) expressam a severidade do SE comparativamente à temperatura base ou referência que são 100°C. A dimensão do  $R_0$  é em minutos, mas é praticado o  $\log R_0$ .

A amostra  $B_{NaOH}$  foi ainda submetida a tratamento alcalino. A 5g ( $\pm 0,0001g$ ) de bambu com SE foi adicionado 120mL de NaOH (0,1M) durante 1 hora em refluxo. O resíduo insolúvel obtido é filtrado num cadinho de vidro G2 (previamente pesado) e neutralizado com água destilada quente.

### 3.2.3 Engaço resultante da actividade vinícola

A amostra de engaço de uva utilizada neste trabalho foi fornecida pela Quinta do Serrado em Penalva do Castelo, Região Demarcada do Dão, Portugal. O engaço foi conservado num recipiente fechado com pouca humidade. Antes da acidificação, a amostra ( $E_{SE}$ ) foi submetida a *steam explosion* tal como se descreveu em 3.2.2. As condições de tratamento para este material apresentam-se na Tabela 10.

**Tabela 10: Condições do processo de pré-tratamento do SE aplicadas ao engaço uva.**

	<i>T</i> (°C)	<i>t</i> (min)	<i>Pressão</i> (bar)	<i>Mistura</i> <i>antes</i> <i>SE(%)</i>	<i>Mistura</i> <i>depois do</i> <i>SE</i>	<i>Ar seco da</i> <i>mistura</i>	<i>logR<sub>0</sub></i>	<i>Rendimento</i> (%)
<b>Engaço</b>	235	2	32	10	47,5	10,8(920)	4,28	82,7

### 3.3 Ensaios de acidificação

#### 3.3.1 Condições de operação

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizados frascos de vidro com um volume total de 100 mL, utilizando-se um volume reaccional 50 mL a operar em modo descontínuo. Após adição da quantidade de substrato, inóculo e meio nutricional necessários (macro e micronutriente) o reactor foi purgado com azoto gasoso para remover todo oxigénio presente e obter condições anaeróbias. Estes foram fechados com septos de borracha e cápsulas de metal, o pH foi acertado para  $6,3 \pm 3$  por adição de NaOH (1M). A temperatura de operação foi mantida a 28°C numa sala aclimatizada com uma incubadora orbital de agitação constante a 180 rpm. A amostragem era diária na fase inicial e depois intervalada.

#### 3.3.2 Composição dos meios nutricionais

A composição do meio nutricional utilizada apresenta-se na Tabela 11.

**Tabela 11: Meio nutricional usado na fermentação acidogénica das amostras de bambu e engaço de uva (A) e na fermentação acidogénica do HSSL (B).**

Meio A		Meio B	
Nutrientes	Concentração (mg/L)	Nutrientes	Concentração (mg/L)
NH <sub>4</sub> Cl	160	NH <sub>4</sub> Cl	160
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	160	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	160
CaCl <sub>2</sub>	80	Ca SO <sub>4</sub>	80
MgSO <sub>4</sub>	160	MgSO <sub>4</sub>	160
NaHCO <sub>3</sub>	800	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80
CoCl <sub>2</sub>	200	FeSO <sub>4</sub>	88
MnCl <sub>2</sub>	30	NaMoO <sub>4</sub>	80
CuCl <sub>2</sub>	10		
ZnSO <sub>4</sub>	100		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo7 O <sub>2</sub>	30		
NiCl <sub>2</sub>	20		

### 3.3.3 Ensaio efectuados

Os ensaios efectuados encontram-se descritos na Tabela 12.

**Tabela 12: Condições experimentais das baterias de testes elaboradas.**

	<i>Biomassa</i>	<i>Carga orgânica</i>	<i>Inoculo</i> (SSV <sub>0</sub> )	<i>Inibidor</i> <i>Metanogénese</i>	<i>Tempo de</i> <i>digestão</i>
HSSL	SSL SSLq SSLs	36 gCQO/L 30 gCQO/L 18 gCQO/L	1 gSSV/L lamas metanogénicas	50 mM BES	30 dias
Aumento inóculo	SSLq <sub>10x</sub> SSLs <sub>10x</sub>	29gCQO/L 19gCQO/L	10 gSSV/L lamas metanogénicas	50 mM BES	15 dias
Aumento carga orgânica	SSLq <sub>15</sub> SSLq <sub>25</sub> SSLq <sub>40</sub> SSLq <sub>60</sub>	15 gCQO/L 25 gCQO/L 40gCQO/L 60gCQO/L	1 gSSV/L lamas metanogénicas	50 mM BES	18 dias
Inibição metanogénica	SSLq <sub>250_15'</sub> SSLq <sub>400_5'</sub> SSLq <sub>400_15'</sub> SSLq <sub>BES</sub> SSLq <sub>Temp</sub> SSLq <sub>s/inibição</sub>	30gCQO/L 25gCQO/L 26gCQO/L 33gCQO/L 33gCQO/L 30gCQO/L	1 gSSV/L lamas metanogénicas	250 MPa (15min) 400 MPa (5min) 400 MPa (15min) 50 mM BES 104°C (2h) -----	30 dias
Bambu e Engaço	B <sub>SE</sub> /B <sub>NaOH</sub> E <sub>SE</sub>	20gSV/L 20gSV/L	2,5 gSV/L lamas metanogénicas	50 mM BES	27 dias

1) Concentrações dos constituintes iniciais do SSL da 1ª bateria

### 3.3.4 Tratamento de inibição da metanogénese

- **Tratamento com BES**

Utilizou-se bromoetanosulfonato (BES) a 98% (Sigma-Aldrich) numa concentração final de 50 mM no meio reaccional de acordo com [48].

- **Tratamento térmico**

O inóculo foi colocado numa estufa durante 2h a 140°C de acordo com o método descrito em [42].

- **Tratamento de alta pressão (APH)**

O tratamento de alta pressão (APH) foi efectuado num equipamento Unipress, modelo U33 (Varsóvia, Polónia), com um vaso gerador de pressão com 100 mL (35 mm diâmetro e 100 mm altura), dispositivo de controlo de temperatura e recipiente para o acondicionamento do produto. Este vaso, construído em aço inoxidável de alta resistência à tensão, uma vez carregado e fechado, é preenchido com o meio de pressurização. Este meio, normalmente, consiste em água misturada com uma pequena percentagem de óleo solúvel para fins de lubrificação e anti-corrosão. Após remoção de todo o ar do vaso, a APH é gerada por compressão.

Os inóculos foram colocados em dois sacos de polietileno. O primeiro foi fechado com o mínimo de ar possível e introduzido noutro saco fechado a vácuo. A amostra é colocada no vaso de pressão onde foi pressurizado a 250 ou 400 MPa durante 5 ou 15 minutos (dependendo do ensaio).

### 3.4 Caracterização das matérias-primas

Esta caracterização foi apenas efectuada para as amostras de bambu visto tanto o HSSL como o engajo de uva já se encontrarem descritos em trabalhos anteriores, respectivamente, em Marques et al (2008)[24] e Prozil (2012) [60].

#### 3.4.1 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade do bambu foi determinado gravimetricamente. Este método baseia-se no registo da perda de massa da amostra ( $1\text{g} \pm 0,001\text{g}$ ), antes e após secagem, durante 3h numa estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ . O procedimento foi repetido até peso constante. O teor de humidade (W) foi determinado utilizando Equação 2.

$$W(\%) = \left(1 - \frac{m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{amostra húmida}}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

#### 3.4.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas (fracção inorgânica) foi determinado por calcinação de  $1\text{g} \pm 0,001\text{g}$  de bambu a  $525^\circ\text{C}$  durante duas horas, de acordo com a Norma Tappi T 211 om-93 [60]. A percentagem de cinzas (Z) foi determinada pela Equação 3:

$$Z(\%) = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

#### 3.4.3 Determinação do teor de extractáveis

##### a) Em acetona

A determinação do teor de extractáveis foi efectuada segundo a Norma Tappi T 204 om-88 [60]. Foram colocadas cerca de 10 g ( $\pm 0,0001$ ) de matéria-prima num soxhlet de 500mL, com 200 mL de acetona. A extracção ocorreu durante 4 horas. O solvente foi evaporado num evaporador rotativo e os extractos foram secos na estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  até peso constante. O teor de extractáveis foi determinado pela equação Equação 4:

$$E(\%) = \frac{m_{\text{extrataveis}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

##### b) Em água quente



Para a determinação de extractáveis em água quente, o bambu livre de extractáveis em acetona foi tratado com uma solução de citrato de amónio (0,10g/mL), procedendo-se ao refluxo desta mistura durante uma hora. O material extraído em água quente foi determinado gravimetricamente de acordo com a Equação 5.

$$E_{H_2O}(\%) = \frac{m_{\text{extractáveis}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times Ke \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

onde,

$$Ke = \frac{100 - E}{100}$$

### 3.4.4 Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo tratamento de cerca de 5 gramas de bambu sem extractáveis com uma solução de 1% de pepsina em 0,1 N HCl. A solução resultante foi colocada a 37°C durante 16 horas [61]. Filtrou-se a solução e o resíduo foi lavado com água quente até à neutralização e seco a 60°C até peso constante. As proteínas foram determinadas por diferença de peso utilizando a Equação 6.

$$P(\%) = \frac{m_{\text{proteínas}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times Ke \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em

que,

$$Ke = \frac{100 - E}{100}$$

Onde, E é o teor de extractáveis em acetona.

### 3.4.5 Determinação do teor de lenhina Klason

O teor de lenhina no bambu foi determinado em amostras livres de extractáveis, proteínas, pelo método de Klason, descrito na norma Tappi T 222 om-88 [60] que quantifica a lenhina como resíduo sólido. O método de Klason é um método de determinação directa e, como tal, tem como princípio, o isolamento e a determinação da lenhina insolúvel em ácido, sendo calculado pela Equação 7.

$$L(\%) = \frac{m_{proteinas}}{m_{amostra\ seca}} \times Ke \times Kp \times Kc \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Em que,

$$Ke = \frac{100 - E}{100} \quad Kp = \frac{100 - p}{100}$$

Onde, E representa o teor de extractáveis em acetona e P o teor de proteínas.

### 3.4.6 Determinação do teor de celulose (Kürschner e Höffer)

O teor de celulose foi calculado pela aplicação do método de *Kürschner Höffner* [62] consiste no tratamento das amostras com ácido nítrico e etanol (1:4, v/v). Este método envolve o refluxo de cerca de 1g ( $\pm 0,0001$ g) de bambu em 50mL de uma solução de ácido nítrico e etanol (1:4, v/v) durante 3 horas. No final de cada hora, o sobrenadante foi retirado por decantação e adicionou-se mais 50 mL da solução de ácido nítrico e etanol (1:4, v/v). O resíduo insolúvel obtido no final das 3 horas é filtrado num cadinho de vidro G2 e lavado com água quente. O teor de celulose das amostras de bambu foi determinado a partir da Equação 8.

$$\text{Celulose}(\%) = \frac{m_{celulose}}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

### 3.4.7 Determinação do teor de hemiceluloses

O teor de hemiceluloses foi calculado pela aplicação da Equação 9.

$$\text{Hemicelulose}(\%) = (\%)Po - (\text{Celulose} + \text{Pectinas}) \quad \text{Equação 9}$$

Onde Po(%) = 100 - (Z + E + L)

Em que, L representa o teor de lenhina, Z o teor de cinzas, E o teor de extractáveis.

### 3.4.8 Determinação de açúcares

Determinação dos açúcares neutros consiste na hidrólise ácida dos polissacarídeos. Os polissacarídeos foram hidrolisados por tratamento de cerca de 10 mg de bambu com 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%. Após incubação, num digestor, durante 3 horas à temperatura ambiente (25 °C), foram adicionados 4,4 mL de água destilada e, posteriormente, foi a incubar a 100 °C, durante mais 2h30 min.

O passo seguinte consistiu na redução dos açúcares: o hidrolisado foi arrefecido e adicionou-se 200 µL de 2-desoxiglucose como padrão interno. Acerca de 1 mL deste hidrolisado adicionou-se, em gelo, 0,2 mL de  $\text{NH}_3$  a 25 % e, em seguida, para reduzir os monossacarídeos a alditóis, adicionaram-se 0,1 mL de  $\text{NH}_3$  3M contendo 150 mg/mL de  $\text{NaBH}_4$ . Incubou-se a 30°C durante 1 hora. Após a redução dos açúcares, procedeu-se à eliminação do  $\text{NaBH}_4$  pela adição de 50 µL (duas adições) de ácido acético glacial, e arrefeceu-se em gelo. Para a acetilação dos alditóis, adicionou-se 0,45 mL de 1-metilimidazola e 3 mL de anidrido acético a 0,3 mL de solução e incubou-se a 30 °C durante 30 minutos. Para a destruição do anidrido acético e extracção dos acetatos de aldidol das amostras foi adicionado 3,75 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Por 3 vezes a solução foi agitada e centrifugada (2000 rpm, 30 segundos), procedendo-se à aspiração da camada superior (aquosa) e adição de 3 mL de água destilada e 2 mL de diclorometano. Procedeu-se à evaporação do diclorometano sob atmosfera de azoto. Seguidamente, adicionou-se 1 mL de acetona à solução e procedeu-se à evaporação da mesma em atmosfera de azoto. Repetiu-se mais uma vez a adição e evaporação da acetona até evaporação completa. O resíduo seco deve ser dissolvido em 100 µL de acetona seca e injectar 1 µL no GC (ou então 50 µL para 0,5 µL). O GC a utilizar é o cromatógrafo de gás Varian 3350, equipado com uma coluna capilar DB-225 J&W (30 m × 0,25 mm i.d., com 0,15µm de espessura de filme) e detector FID, usando  $\text{N}_2$  como gás de arraste, com as seguintes condições cromatográficas: temperatura do injecto 225°C, temperatura da coluna 220°C e temperatura do detector 250°C [60].

### 3.4.9 Determinação conteúdo em metais pesados

A determinação do conteúdo em metais pesados consiste num varrimento do espectro de massas entre 5 e 250 a.m.u. (unidades de massa atómica) e na comparação do sinal obtido com o de um padrão.

### 3.5 Métodos analíticos

#### 3.5.1 pH

O pH das amostras foi medido num aparelho de bancada Consort C-535.

#### 3.5.2 Sólidos

A determinação de sólidos totais (ST), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV) e sólidos voláteis (SV) foi realizada segundo os métodos 2540 B 2540 D e 2540 E e G, respectivamente do *Standard Methods* da APHA (1998) Um volume de 2,5 mL de amostra foram filtrados com membrana de fibra de vidro de poro de 1 µm (Whatman) que posteriormente foi seca na estufa a 105°C durante 24 horas para determinação dos sólidos suspensos totais. Seguidamente, o mesmo filtro contendo a biomassa seca foi calcinado na mufla a 550°C para determinação dos sólidos suspensos voláteis. Os sólidos suspensos voláteis correspondem à biomassa (matéria orgânica) em suspensão contida na amostra, enquanto os sólidos suspensos totais representam a matéria orgânica e inorgânica em suspensão na amostra.

$$SST/ST (mg.L^{-1}) = \frac{massa_{estufa} (mg) - massa_{cadin ho+filtro} (mg)}{V_{amostra} (L)} \quad \text{Equação 10}$$

$$SSV/SV (mg.L^{-1}) = \frac{massa_{estufa} (mg) - massa_{mufla} (mg)}{V_{amostra} (L)} \quad \text{Equação 11}$$

#### 3.5.3 Carência química de oxigénio

A Carência Química de Oxigénio (CQO) é uma medida da fracção orgânica da amostra susceptível de ser oxidada por um oxidante químico em condições controladas. Para determinação deste parâmetro foi utilizado o método do refluxo fechado com determinação por espectrofotometria (método 5520 D descrito em APHA (1998) [56]. Neste método foi utilizado dicromato de potássio em excesso, em condições ácidas, como oxidante. A 2,5 mL de amostra adicionaram-se 1,5 mL de dicromato de potássio, 3,5 mL de solução de digestão (contendo ácido sulfúrico de forma proporcionar condições ácidas. A digestão foi realizada durante duas horas a 150°C. A absorvância das amostras digeridas foi medida utilizando um espectrofotómetro (marca Aqualytic, modelo PC023212), que converte as absorvâncias directamente em concentração

(mgO<sub>2</sub>/L). Quando se pretendeu estudar a carência química de oxigénio relativa a fracção filtrada (CQO solúvel), efectuou-se previamente a sua filtração com papel de filtro (marca Whatman; grade 403). Para cada amostra fizeram-se sempre três réplicas.

### 3.5.4 Determinação AOVs, açúcares e etanol

As amostras foram analisadas num sistema de cromatografia líquida de alta pressão (*High Pressure Liquid Chromatography* - HPLC). Com uma coluna de troca iónica com enchimento Eurokat® colocada num forno ParalabGecko 2000 a 40°C, o eluente usado foi 0,01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e foi bombeado com um fluxo de 0,4 mL/min por uma bomba Gilson modelo 307e. A detecção dos vários compostos foi feita por um detector de índice de refração Gylson modelo 131 O eluente foi preparado com água milli-Q e foi filtrado a vácuo com filtro 0,2 µm e desarejado. Para análise dos cromatogramas obtidos foi usado o software UniPoint.

Antes da injeção as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm, para retirar biomassa. O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado num sistema discal de filtros de acetato de celulose 0,2 µm (Whatman) a 10000 rpm.

A calibração foi efectuada com diferentes concentrações dos compostos em causa estudados, as rectas de calibração encontram-se na Tabela 24 do anexo A.

### 3.5.5 Determinação dos Lenhossulfonatos

O teor de lenhossulfonatos foi calculado por espectrofotometria de UV com um comprimento de onda de 273 nm [21] num Espectrofotómetro UVmini-1240. A medição da amostra obrigou a diluições entre 200 e 400 vezes.

$$C \text{ (g/L)} = \frac{A}{\epsilon_{273 \text{ nm}}}$$

**Equação 12**

Onde  $\epsilon$  (273nm)= 7,4 l/g.cm.

### 3.6 Caracterização das populações microbianas

O método utilizado para a caracterizar das populações mistas em estudo foi o método molecular FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Este método consiste em três passos principais: fixação em paraformaldeído e etanol, hibridização com as sondas moleculares e observação das amostras ao microscópio de epifluorescência. A hibridização foi levada a cabo no Grupo de Microbiologia Ecologia e Microbiologia e Tecnologia (MET), Centro REQUINTE /Química Fina e Biotecnologia (CQFB) Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

#### *a) Fixação das células*

Inicialmente centrifugou-se 1 mL de amostra, procedeu-se à sua lavagem com PBS e ressuspendeu-se novamente com PBS (máximo 4000 rpm). A amostra foi fixada com a adição de três volumes de 4% de paraformaldeído (900 µL) a um volume de células suspensas. Incubou-se de seguida a solução durante a noite a 4°C. O sobrenadante foi removido da amostra após centrifugação (5 min) e lavada duas vezes com solução 1xPBS e adicionado a um volume (500µL) de etanol. A amostra foi armazenada a -20°C.

#### *b) Hibridização*

Para a hibridização colocou-se em lâminas com 10 poços, 10 µl da amostra fixada por poço e secou-se durante 10 min a 46°C. De seguida desidratou-se a amostra colocada na lâmina pela passagem em concentrações crescentes de etanol a 50, 80 e 100% durante 3 min cada, deixando secar à temperatura ambiente. Adicionou-se à amostra 10 µl da solução de hibridização (0-30% em formamida) e 1µl de cada sonda (Tabela 25) com uma concentração máxima de 30ng/µl, com o cuidado de não tocar raspar a amostra seca. As lâminas foram imediatamente transferidos para tubos de hibridização (tubo de Falcon com papel humedecido com o resto da solução de hibridização) e incubados a 46°C durante 1,5 horas. Após incubação as lâminas foram passadas por uma solução de lavagem, deixando incubar durante 10 min em banho a 48°C. A solução de lavagem foi retirada com água destilada e as lâminas secas com ar comprimido de forma cuidadosa para não remover as células. Foram colocados nas lâminas, algumas gotas de Vectashield antes da colocação da lamela que posteriormente foi selada com verniz.

As preparações foram observadas em microscopia de contraste de fase e epifluorescência num microscópio Olympus BX51.

As sondas utilizadas encontram-se na Tabela 25 do anexo B, assim como composição das soluções de hibridização, lavagem e paraformaldeído.

### 3.7 Cálculos

A concentração de AOVs açúcares e etanol obtida em g/L no HPLC foram convertidas em gCQO/L (Equação 13). Os factores de conversão (fc) encontram-se na Tabela 13 tendo sido calculados pelas reacções de oxidação dos compostos:

**Tabela 13: Factores de conversão em CQO.**

fc (gO <sub>2</sub> /g)		fc (gO <sub>2</sub> /g)	
<b>HAc</b>	1,07	<b>EtOH</b>	2,43
<b>HBut</b>	1,81	<b>xyI</b>	1,07
<b>HPr</b>	1,51	<b>glc</b>	1,07
<b>HLac</b>	1,07		

$$\text{Concentração}_{(\text{gCQO/L})} = \text{Concentração}_{(\text{g/L})} \times \text{fc}_{(\text{gO}_2/\text{g})} \quad \text{Equação 13}$$

A quantidade de AOV<sub>T</sub> (totais produzidos - ΔAOV<sub>T</sub>) nas fermentações foi calculada pela diferença da concentração máxima dos AOVs menos a concentração inicial.

$$\Delta \text{AOV}_T = \text{AOV}_{T_{out}} - \text{AOV}_{T_{in}} \quad [\text{mgCQO/L}] \quad \text{Equação 14}$$

Calculou-se dois tipos de rendimento relativos à quantidade de substrato consumido, primeiro em relação ao consumo de SCQO (Y<sub>AOV</sub>) e o segundo relativo aos açúcares simples (Y<sub>AOV/S</sub>), em algumas baterias existiam etanol que foi também contabilizado neste cálculo. Y<sub>AOV/SS0</sub> (gCQO/gSSV<sub>0</sub>) é o rendimento de ácidos obtidos pela quantidade de biomassa inicial.

$$Y_{\text{AOV}} = \frac{\Delta \text{AOV}}{(\text{SCQO}_{in} - \text{AOV}_{T_{in}}) - (\text{SCQO}_{out} - \text{AOV}_{T_{out}})} \frac{[\text{mgCQO/L}]}{[\text{mgCQO/L}]} \quad \text{Equação 15}$$

$$Y_{\text{AOV/S}} = \frac{\Delta \text{AOV}}{(\text{xilose} + \text{glicose})_{consumida}} \frac{[\text{mgCQO/L}]}{[\text{mgCQO/L}]} \quad \text{Equação 16}$$

A taxa de produção volumétrica ( $r_{AOV}$  em mgCQO/L.h) foi calculada pela regressão linear da concentração de AOVs versus tempo. Esta taxa foi calculada em duas fases uma de consumo rápido do substrato e outra do consumo lento.

Por último a taxa específica de produção de AOVs ( $q_{AOV}$  em mgCQO/mgSSV.h) foi calculada dividindo a taxa de produção volumétrica pela biomassa no final da operação (valor relativo aos sólidos suspensos voláteis).





# Capítulo 4 – Resultados e Discussão

## 4.1 Caracterização química dos substratos

Antes da utilização dos substratos escolhidos em processos de acidificação foi necessário saber a sua composição em matéria orgânica.

### 4.1.1 HSSL

O HSSL usado foi caracterizado quimicamente por Marques et al. [24] mas foi necessário determinar a carência química em oxigénio total (TCQO) e solúvel (SCQO) das três fracções deste resíduo, utilizadas neste trabalho. As fracções de HSSL utilizadas foram licor proveniente da unidade fabril sem qualquer tipo de tratamento (SSL), licor com pré-tratamento químico (SSLq) e licor resultante produção de bioetanol (SSLs). A quantificação apresenta-se na Tabela 14.

**Tabela 14: Caracterização em CQO total (TCQO) e solúvel (SCQO) das três fracções de HSSL estudadas:**

	SSL	SSLq	SSLs
TCQO (g/L)	211,3±32	193,3±22	119,7±11
SCQO (g/L)	205,7±23	191,6±16	105,0±2

Analisando os resultados da Tabela 14 verifica-se que o nível de pré-tratamento influenciou o valor carência química de oxigénio tanto total como solúvel. Após o tratamento químico o SCQO diminuiu ligeiramente desde 205,7 g/L no SSL para 191,6 g/L no SSLq devido à precipitação de compostos fenólicos. Como o SSLs foi obtido após dois tratamentos biológicos, esta fracção apresentou um valor de SCQO mais baixo, cerca de 105 g/L. Este valor corresponde ainda assim a cerca de 50% do CQO presente no SSL original. Esta diminuição deveu-se ao facto de o SSLs ter sofrido não só a fermentação etanólica por *Scheffersomyces stipitis* que removeu grande parte dos açúcares simples, mas também pelo anterior pré-tratamento com *Paecilomyces variotti*. Este pré-tratamento tem por objectivo destoxificar o HSSL removendo compostos fenólicos de baixo peso molecular, inibidores de *S. stipitis*. [15].

## Resultados e Discussão

### 4.1.2 Bambu

A composição do bambu determinada antes e depois de ser sujeito a um pré-tratamento por *steam explosion* apresenta-se na Tabela 15.

**Tabela 15: Composição química do bambu natural e após *steam explosion*.**

Composição	Bambu natural	Bambu ( <i>Steam Explosion</i> )
		Percentagem (%)
Cinzas	3,40	3,40
Extractáveis:		
Acetona	4,7	24,8
Água quente	18,7	13,1
Celulose Kürschner - Höffer	42,1	42,6
Proteínas	17,5	11,1
Taninos <sup>1)</sup>		10,2
Lenhina Klason	19,1	7,90
Hemicelulose	13,8	6,2 <sup>2)</sup>

1) Não foram determinados para o bambu natural.

2) Ajustado pela análise de açúcares simples (glicose e xilose)

Com a aplicação de SE ocorreram duas grandes alterações na constituição do bambu. A primeira resultou num aumento considerável dos extractáveis em acetona de 4,7% para 24,8%. Os extractáveis detectados são compostos de baixo peso molecular com diferentes polaridades. Para os identificar efectuaram-se extracções com acetona e água quente. Comparativamente à madeira quando se extrai com água, os principais compostos encontrados são normalmente, sais inorgânicos, açúcares, proteínas, polissacarídeos e algumas substâncias fenólicas. Os extractáveis solúveis em acetona costumam ser ácidos gordos, ésteres, álcoois de cadeia longa, e compostos fenólicos [60]. A segunda alteração na composição foi a diminuição de 12 % do teor de lenhina, que está relacionada com o aumento de extractáveis, pois pela acção que o SE dá-se a quebra das ligações intra e intermoleculares na matriz lenhocelulósica [8], e parte dos compostos fenólicos resultantes são então quantificados nos extractáveis em cetona. A diminuição da lenhina expõe a celulose e hemicelulose que estavam anteriormente refinadas na microfibrila celular (Figura 3). O aumento da quantidade de extractáveis deve ser um dos parâmetros a resolver em trabalhos futuros, pois uma das desvantagens do SE é originar derivados de furano e compostos fenólicos [63] que são extraídos com acetona e podem inibir os microrganismos.

O teor de cinzas do bambu analisado foi de 3,4 % (material inorgânico) estando de acordo com os dados da literatura para outros tipos de bambu (Tabela 3 da Revisão Bibliográfica) [25]. Relativamente à determinação de holocelulose (celulose mais hemicelulose) obteve-se o valor de 54,7% um pouco inferior ao indicado na literatura, de cerca de 60% [25]. O teor de taninos não foi determinado no primeiro caso, pois a percentagem de lenhina obtida (19%) indica uma quantidade residual de taninos [28]. Tal como se esperava o bambu é uma biomassa celulósica com potencialidade para acidificação devido à composição das suas fibras. Quando sofreu SE para além do teor de lenhina diminuir com o processo (esta foi redistribuída), ocorreu o aumento da solubilidade da celulose, devido à disrupção das ligações estáveis. Todas consequências que beneficiam a actuação dos microorganismos.

Como se trata de um resíduo da biorremediação de solos, o bambu utilizado poderia conter metais pesados inibidores da actividade microbiana. Na Tabela 16 apresenta-se a análise dos metais pesados presentes nas cinzas do bambu.

**Tabela 16: Análise elementar do conteúdo em metais (mg do elemento por kg de cinza)**

Elemento	mg/kg	Elemento	mg/kg	Elemento	mg/kg
<b>B</b>	100	<b>Ti</b>	200	<b>Zn</b>	400
<b>Na</b>	13000	<b>V</b>	8,0	<b>Ga</b>	1,0
<b>Mg</b>	19000	<b>Cr</b>	100	<b>As</b>	3,0
<b>Al</b>	3000	<b>Mn</b>	2000	<b>Se</b>	7,0
<b>Si</b>	59000	<b>Fe</b>	6000	<b>Rb</b>	300
<b>P</b>	28000	<b>Co</b>	4,0	<b>Sr</b>	80
<b>K</b>	300000	<b>Ni</b>	500	<b>Zr</b>	8,0
<b>Ca</b>	17000	<b>Cu</b>	200	<b>Mo</b>	7,0
<b>Gd</b>	0,4	<b>Pb</b>	10	<b>U</b>	0,3

Pela análise da Tabela 16 verifica-se que as cinzas continham uma grande quantidade de elementos essenciais, como sódio, magnésio, potássio ou cálcio. A análise revela ainda valores consideráveis de cromo, ferro, níquel, manganês, magnésio e zinco, metais pesados que podem influenciar o desempenho dos microorganismos presentes nas lamas metanogénicas.

Para uma caracterização mais detalhada da fracção polissacarídica do bambu pré-tratado com *steam explosion*, realizou-se também a análise aos açúcares na matéria-prima original. A Tabela 17 apresenta a composição média em monossacarídeos do bambu. Pela análise verifica-se

## Resultados e Discussão

que a glucose (84,9%) e a xilose (12,6%) são os monómeros presentes em maior quantidade. A glucose resulta essencialmente da quebra de ligações de celulose, mas também de algumas hemiceluloses. Já a presença significativa de xilose sugere a presença de xilanas.

**Tabela 17: Composição média em monossacarídeos do bambu com *steam explosion*.**

Monómeros	$\%(m_{\text{mon}}/ m_{\text{t mon}})$
Ramnose	0,40
Fucose	0,34
Ribose	0,20
Arabinose	0,67
Xilose	12,6
Manose	0,39
Galactose	0,47
Glucose	84,9

$m_{\text{mon}}$  – massa de monossacarídeos

$m_{\text{t mon}}$  – massa total de monossacarídeos

## 4.2 Fermentação acidogénica

### 4.2.1 Licor do cozimento ao sulfito

O primeiro substrato a ser estudado foi o HSSL nas diferentes fracções já mencionadas e explicadas na Figura 8. Os parâmetros de operação encontram-se discriminados na Tabela 12. O HSSL é um subproduto da indústria papelreira com um elevado teor de açúcares, cerca de 44 g/L, das quais 20,5 g/L correspondem à xilose (Tabela 1). Sendo um açúcar, a xilose pode servir como substrato a ser transformado pelas culturas mistas em precursores químicos – AOVs [47].

Na Figura 9 apresentam-se os perfis de formação de AOVs para a fracção SSL:

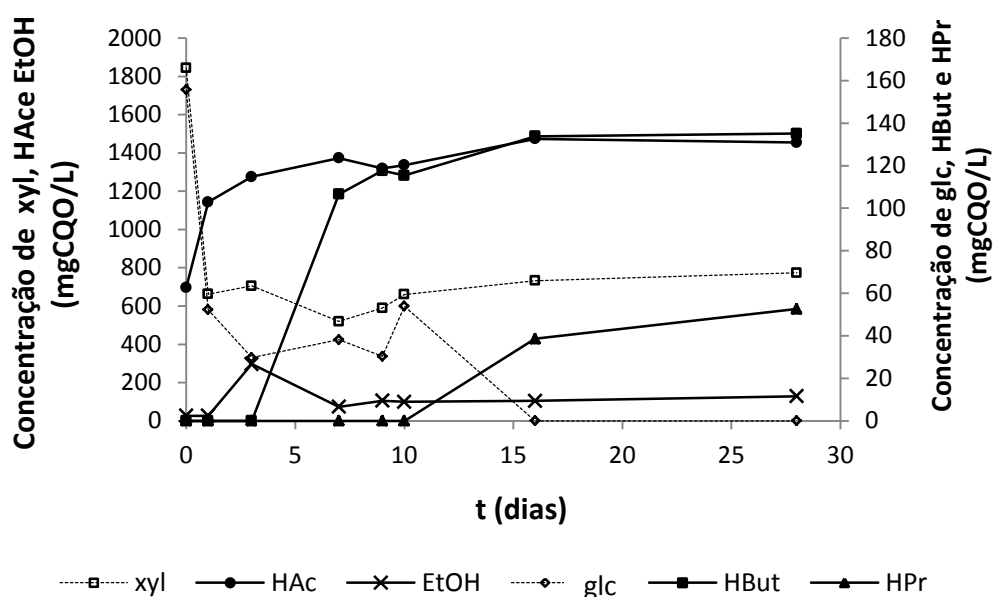


Figura 9: Formação de AOV ao longo do tempo de digestão no SSL.

Após 30 dias de fermentação, os AOVs produzidos foram maioritariamente os ácidos acético (759 mgCQO/L), n-butírico (135 mgCQO/L) e propiónico (52,6 mg CQO/L). Este foi o resultado esperado pois estes são os AOVs mais frequentemente obtidos nas fermentações acidogénicas a partir dos resíduos da indústria da pasta de papel [58]. A xilose e a glucose, os açúcares simples presentes nesta fracção, não foram metabolizados da mesma forma. Não houve a digestão completa da xilose, cujo consumo cessou após o 3º dia quando ainda existia no meio cerca de um terço da quantidade inicial. Em relação à glucose, mesmo em quantidades muito baixas, apenas foi consumida após o 10º dia. Esta dificuldade na fermentação dos açúcares poderá ter resultado da presença de derivados fenólicos resultantes da degradação da lenhina e dos extractivos da madeira que podem inibir a actividade microbiana [64]. Estes compostos fenólicos podem causar perda da integridade das membranas biológicas, afectando a sua capacidade de agir como barreira selectiva e matriz das enzimas [15], o que pode ter afectado a digestão da xilose, resultando na paragem da produção de AOVs.

Na Tabela 18, apresentam-se como parâmetros: a concentração de cada ácido formado; a concentração total de AOVs formados ( $\Delta AOV_T$ ); o rendimento de AOVs tendo como substrato o CQO ( $Y_{AOV}$ ); os açúcares ( $Y_{AOV/S}$ ) e a biomassa inicial ( $Y_{AOV/SSVo}$ ). As taxas de produção volumétrica foram calculadas em duas fases, consumo rápido de CQO ( $r_{AOV}^1$ ) e consumo lento ( $r_{AOV}^2$ ) e por último foram calculados as taxas de produção específica dos AOVs ( $q_{AOV} \times 10^3$ ). Estes parâmetros foram obtidos de acordo com as equações da secção 3.3.4 dos materiais e métodos.

## Resultados e Discussão

Tabela 18 Parâmetros calculados da fermentação acidogénica.

		SSL	SSLq	SSLs	SSL' <sup>3)</sup>
$\Delta AOV_T$ (mgCQO/L)		946	2521	1449	825,6
$HAc$ (mgCQO/L)		759	628	1207	160,9
$HPr$ (mgCQO/L)		52,6	227	242	66,20
$HBut$ (mgCQO/L)		135	1620	241	598,47
$Y_{AOV}$ (gCQO/gCQO)		0,09	0,45	0,42	0,66
$Y_{AOV/S}$ (gCQO/gCQO)		0,67	1,51	3,85	0,58
$Y_{AOV/SSVo}$ (gCQO/gSSV)		0,95	2,52	1,45	0,83
$r_{AOV}^1$ (mgCQO/L.h)		4,67	11,4	8,24	4,96
$r_{AOV}^2$ (mgCQO/L.h)		1,59	3,64	2,16	-
$q_{AOV} \times 10^3$ (gCQO/gSSV.h)		0,58	1,19	0,99	1,53
<b>pH</b>	<i>inicial</i>	6,44	6,26	6,67	6,55
	<i>final</i>	4,28	5,62	6,03	5,81
<b>Composição AOVs (percentagem baseada em moles)</b>	<b>%HAc</b>	89,59	46,19	83,62	7,18
	<b>%HPr</b>	4,30	8,97	9,65	8,26
	<b>%HBut</b>	6,11	44,84	6,74	84,56

1 -) Consumo CQO rápido

2) Consumo CQO lento

3) Meio sintético do SSL

Os resultados da Tabela 18 mostram que a fracção SSL não é dos melhores substratos para a fermentação acidogénica, pois apenas 9% do CQO total foram convertidos em AOVs, além de um terço da xilose não ter sido consumida. Esta situação terá ocorrido primeiro devido à grande quantidade de CQO recalcitrante da carga orgânica inicial (36 gCQO/L) e segundo pela presença de inibidores.

A Figura 10 apresenta a evolução da fermentação da fracção SSLq obtida após pré-tratamento químico com KOH e arejamento.

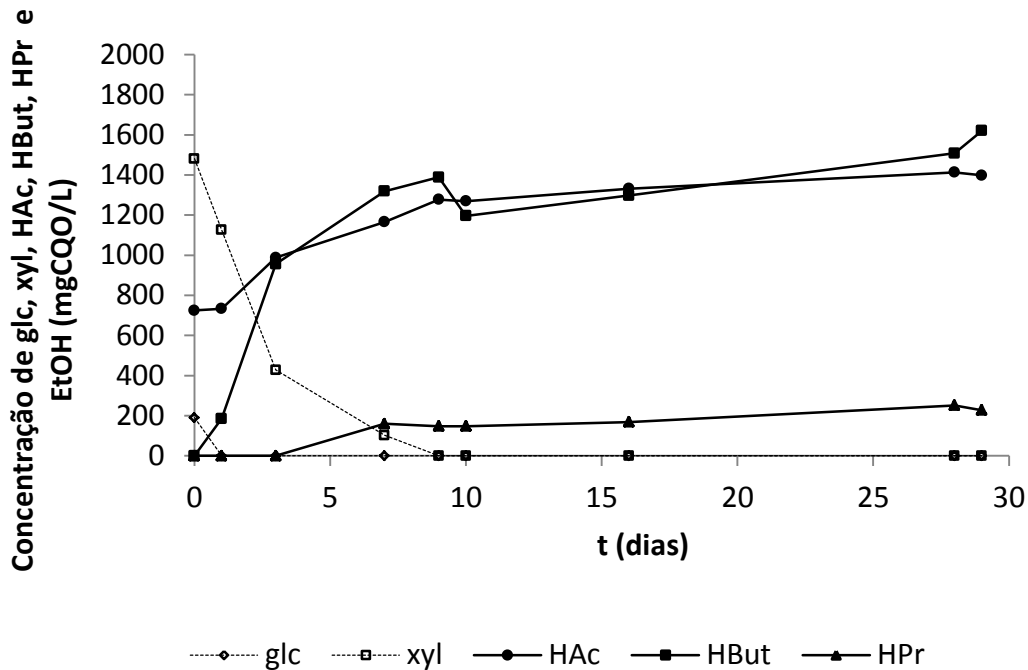
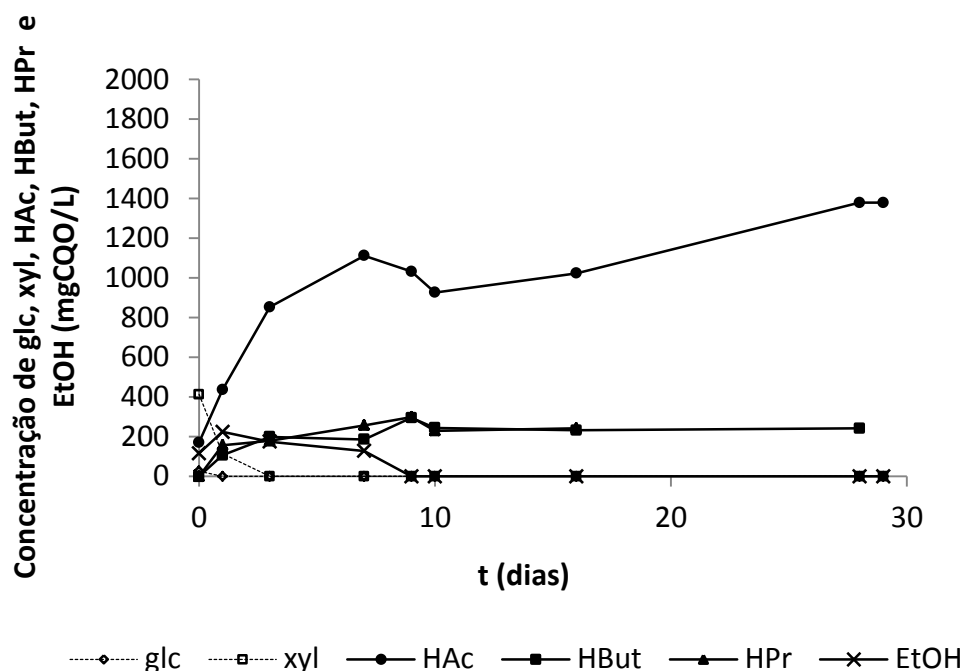


Figura 10: Fermentação acidogénica do substrato SSLq.

Neste ensaio também foram obtidos os mesmos ácidos que na fermentação anterior: ácido acético (628 mgCQO/L), ácido propiônico (227 mgCQO/L) e ácido n-butírico (1620 mgCQO/L). Também se verificou o aparecimento de ácido láctico, mas em quantidades vestigiais. Ao contrário do SSL, no ensaio com SSLq os monossacáridos presentes foram consumidos na totalidade e logo na fase inicial da digestão, até aos 9 dias. Como consequência, a produção e o rendimento de AOVs no SSLq foi superior ao do licor SSL havendo a formação de mais 1575 mgCQO/L de AOVs (Tabela 18). O aumento da quantidade de AOVs obtidos com este substrato deveu-se ao pré-tratamento aplicado que possibilitou a remoção de compostos fenólicos como furfurais, conhecidos inibidores fermentativos [64]. Este pré-tratamento não alterou significativamente o teor de xilose (1800 mgCQO/L no SSL e 1500 mgCQO/L SSLq).

A terceira fracção de HSSL estudada, o SSLs é o efluente resultante da produção biológica de etanol por *Sheffersomyces stipitis* [15]. Para obtenção do bioetanol o HSSL, além do pré-tratamento químico, sofreu um pré-tratamento biológico (ver Figura 8 com esquema e explicação da origem dos efluentes). Apesar de *S. stipitis* durante o processo de produção de etanol consumir os monossacáridos, a fracção recolhida apresentava cerca de 18 gCQO/L constituindo-se como um efluente com elevada carga orgânica, que pode ser utilizada para a digestão anaeróbia. Na Figura 11 apresentam-se os resultados da fermentação acidogénica da fracção SSLs:





**Figura 11: Fermentação acidogênica do substrato SSLs.**

Tal como nas fermentações anteriores, os AOVs obtidos foram o ácido acético (1207 mgCQO/L), ácido butírico (241 mgCQO/L) e ácido propiônico (242 mgCQO/L). Ao contrário do que deve ocorrer no processo real, não se separou o etanol, produto da fermentação de *S. stipitis*, e por isso este composto também serviu como substrato para a formação de AOVs. Esta foi a fracção que permitiu obter maiores rendimentos quando se compararam os valores totais de AOVs das três fracções do HSSL como mostra a Tabela 18 com rendimento ( $Y_{AOV/s}$ ) de 3,85 gCQO/gCQO.

Comparando os gráficos das Figura 9, Figura 10 e Figura 11 constata-se que existiram sempre duas fases de degradação distintas. Na primeira fase, observa-se o consumo rápido de CQO (primeiros 10 dias) durante a qual se observou a degradação dos açúcares e a maior quantidade de AOVs formada. Na segunda fase, a formação de AOVs para os três ácidos foi mais lenta e ocorreu na ausência de monossacarídeos (SSLq e SSLs), ou na sua presença mas sem consumo (SSL). Isto revela que outros compostos presentes foram utilizados como substrato. Na passagem entre as duas fases ocorreu sempre uma ligeira diminuição dos AOVs formados. Desta forma foi possível determinar valores de taxas volumétricas de formação de AOVs designadas por consumo lento e rápido de CQO (Tabela 18).

No caso do SSLq, a taxa volumétrica de formação de AOVs da primeira fase foi 3,13 vezes superior à da segunda, no caso o SSLs, 3,81 vezes superior. Entre as possíveis fontes de carbono podem ser incluídos os xilooligossacarídeos (XOS), oligossacarídeos de cadeias mais curtas formados por unidades de xilose, que representam 30 % do HSSL [24]. Desta forma a degradação dos XOS por microrganismos presentes no consórcio misto, iria permitir o fornecimento de açúcares às bactérias acidogénicas. Além disso, sendo o processo de hidrólise mais lento que o de acidificação, resultaria no abrandamento da taxa de produção de AOVs e na dificuldade de detectar açúcares livres no meio devido ao consumo imediato. Os lenhossulfonatos (LS) podem também ter funcionado como substrato, pois vários estudos com dímeros de lenhina mostraram que as suas ligações podem ser clivadas anaerobiamente, e oligómeros de lenhina de 3- 7 unidades podem ser parcialmente biodegradados [65].

Após a quantificação dos valores, verificou-se uma diminuição de cerca de 16%, 10% e 26% de LS para SSL, SSLq e SSLs, respectivamente. O uso deste material recalcitrante poderá ter conduzido a uma adaptação fenotípica da cultura.

Pela análise da Tabela 18 verifica-se que o rendimento em AOVs em relação à fracção orgânica solúvel consumida ( $Y_{AOV}$ ) foi baixo para todas as fracções de HSSL, obtendo-se o valor mais baixo, 0,09 gCQO/gCQO, no ensaio com SSL. Isto poderá significar que parte do substrato consumido terá sido utilizada para manutenção celular. Contudo os valores de rendimento em AOVs em relação aos açúcares simples (xilose e glucose) foram superiores a 1 nos substratos com pré-tratamento, SSLq e SSLs, 1,67 gCQO/gCQO e 3,85 gCQO/gCQO, respectivamente. Estes resultados principalmente o SSLs podem indicar o uso de outro tipo de substrato além dos açúcares iniciais quantificados por HPLC.

O resultado obtido para SSLs resulta do facto de ser a fracção com menos açúcares disponíveis pois uma parte significativa foi consumida por *S. stipitis* durante a produção de bioetanol. Além disso, o valor de rendimento elevado pode também resultar do facto de a fracção corresponder a um efluente que sofreu pré-tratamentos/fermentações consecutivas. Durante o processo com *P. variotti*, anterior ao de *S. stipitis*, Pereira et al (2011) verificou que ocorria a remoção de compostos de baixo peso molecular como pirogalol, ácido gálico, seringaldeídos ou ácido vanilínico os quais apresentam efeitos inibitórios no metabolismo fermentativo [15]. Esta remoção dos compostos inibitórios assume uma vantagem na maximização das fermentações relativamente às outras fracções de HSSL. Por outro lado, os sucessivos pré-tratamentos químico e biológicos da fracção SSLs poderão ter contribuído para o aparecimento de compostos fermentáveis como produtos secundários resultantes das fermentações anteriores como lípidos e

## Resultados e Discussão

---

proteínas ou os já referidos compostos resultantes da acção de enzimas hidrolíticas para degradar oligossacárideos.

Em relação aos valores de composição dos AOVs formados nas três fracções do HSSL testadas (Tabela 18) obtiveram-se diferentes proporções. No SSL, o ácido acético foi o ácido maioritário (89,59%), enquanto os ácidos propiónico e butírico formaram-se praticamente nas mesmas percentagens (4,30 e 6,11% respectivamente). A mesma relação entre os AOVs verificou-se na fracção SSLs, embora com diferentes valores, o ácido acético é maioritário (83,6%), havendo proporções semelhantes de ácido propiónico e ácido butírico (9,65% e 6,74% respectivamente). No caso da fracção SSLq, produziram-se em quantidades semelhantes, 45%, o ácido acético e ácido butírico, sendo os restantes 10%, ácido propiónico.

No trabalho de fermentação acidogénica de águas residuais industriais Bengtsson et al (2008) apresenta valores de AOVs totais formados de 2270 mgCQO/L para o soro de leite, 2070 mgCQO/L para um efluente de pasta de papel. Valores ligeiramente inferiores aos obtidos pelo substrato SSLq (2521 mgCQO/L), mostrando a potencialidade deste subproduto industrial em fermentações acidogénicas.

Em suma, os maiores rendimentos em AOVs obtidos com SSLq e SSLs relacionam-se com as menores quantidades de compostos tóxicos. Isto evidencia a necessidade de um pré-tratamento para o bioprocessamento do HSSL proveniente da unidade fabril antes do processo de acidificação. Os resultados obtidos com estes ensaios mostram que é possível aplicar fermentação acidogénica às várias fases do processo de valorização do HSSL.

### 4.2.2 Ensaio em meio sintético

De forma a compreender melhor algumas das variações verificadas na bateria de ensaios anterior, como a formação de EtOH e o consumo parcial de xilose no teste com a fracção SSL, procedeu-se a um ensaio com meio sintético (SSL'). Meio este com as mesmas condições da bateria de ensaios anterior mas apenas com as concentrações iniciais de açúcares simples e ácido acético.

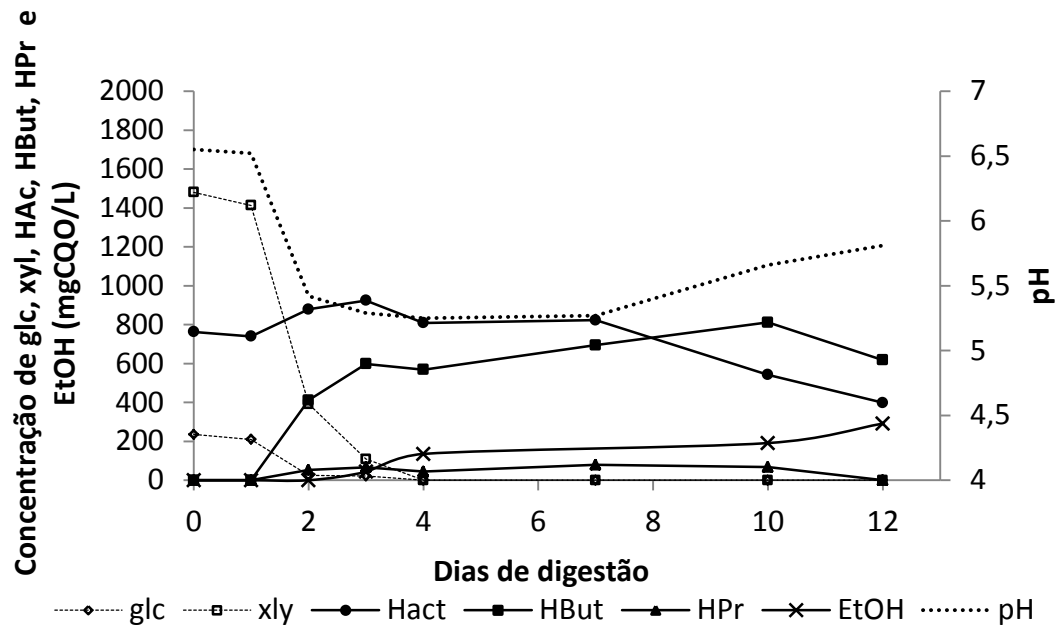


Figura 12: Fermentação acidogénica do substrato SSL' (sintético).

Nesta experiência verificou-se que os açúcares foram consumidos na sua totalidade e mais rapidamente quando comparados com a experiência com SSL real, necessitando apenas de quatro dias para a sua exaustão. Isto pode confirmar a presença de compostos inibitórios no SSL que afectam significativamente o metabolismo da cultura mista usada. Após a exaustão dos açúcares, observou-se uma diminuição do ácido acético ao sétimo dia e do ácido butírico ao décimo dia, acompanhado por um aumento da quantidade de etanol e do valor de pH. Esta subida pode ser explicada pelo facto de estarem a ser consumidos ácidos e ser formado um composto neutro.

No SSL' (meio sintético) o rendimento de AOVs tendo por base os açúcares como substrato ( $Y_{AOV/S}$ ), foi de 0,58 gCQO/gCQO inferior ao análogo SSL com 0,67 gCQO/gCQO. Este resultado reforça a ideia do consumo de outra fonte de carbono no SSL para além dos açúcares iniciais, pois mesmo sem o consumo total da xilose (Figura 9) obteve maior quantidade em AOVs (950 mgCQO/L face aos 825mgCQO/L do SSL').

#### 4.2.3 Efeito da concentração das lamas

Na bateria de ensaios anteriores, o consumo de açúcares simples foi muito lento, cerca de 10 dias. Desta forma, decidiu-se aumentar a quantidade de inóculo de modo a diminuir o tempo

## Resultados e Discussão

do processo de produção. Esta bateria de ensaios foi realizada utilizando as fracções de SSLq e SSLs (que permitiram os melhores rendimentos anteriormente), ao que se acrescentou um inóculo de 10 gSSV/L. Os dois ensaios efectuados designaram-se por SSLq<sub>10x</sub> e SSLs<sub>10x</sub>.

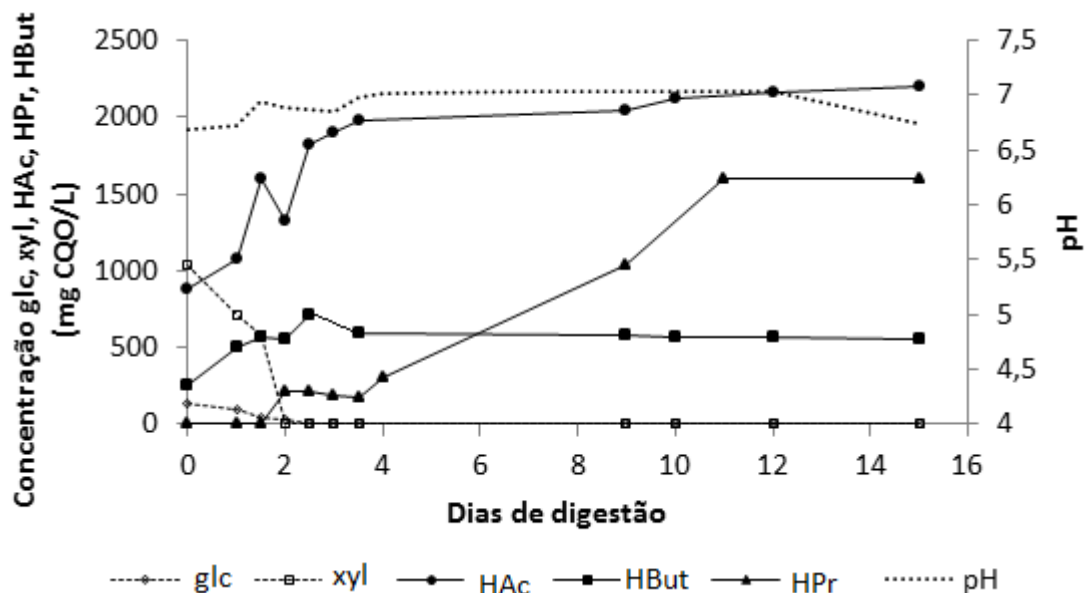


Figura 13: Evolução do processo de digestão anaeróbia do ensaio SSLq 10x.

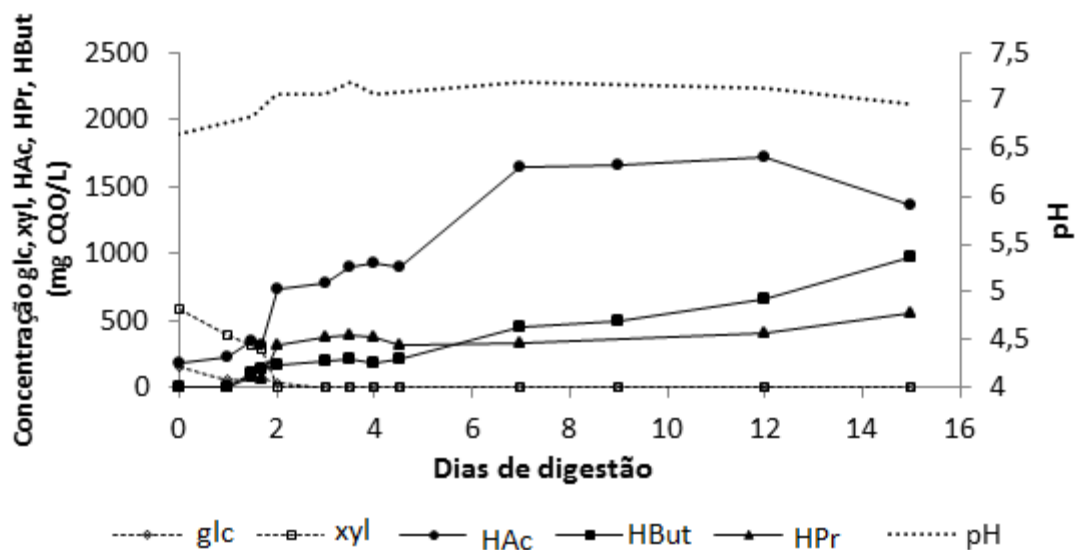


Figura 14: Evolução do processo de digestão anaeróbia do ensaio SSLs 10x

Como era esperado, a xilose e a glucose foram totalmente consumidas após um tempo mais curto de digestão, 2 e 3 dias para os ensaios SSLq<sub>10x</sub> e SSLs<sub>10x</sub>, respectivamente. Produziram-se também quantidades maiores de AOVs totais tanto no SSLq<sub>10x</sub> (3225 mgCQO/L) como no SSLs<sub>10x</sub> (2742 mgCQO/L) (Tabela 19). Este aumento de concentração resultou do facto de existir uma

maior quantidade de microrganismos consumindo assim maior quantidade de substratos como os XOS e os LS presentes nas fracções.

Como se pode observar na (Tabela 19), os valores das taxas volumétricas de produção de AOVs mostram um aumento considerável nos dois casos. No SSLq<sub>10x</sub> obteve-se 42,8 mgCQO/L.h, superior ao valor obtido no ensaio SSLq 11,4 mgCQO/L.h. No ensaio SSLs<sub>10x</sub> a taxa de produção volumétrica foi de 17,26 mgCQO/L.h, um valor superior ao SSLs com 8,24 mgCQO/L.h.

Tal como nos ensaios anteriores, os AOVs formados foram os ácidos propiónico, acético e n-butírico. Para o substrato SSLq<sub>10x</sub> verificou-se um aumento de AOVs totais superior a 239% ao SSLq (para o mesmo período fermentativo). Relativamente ao SSLs<sub>10x</sub>, formaram-se mais 71% AOVs comparativamente ao ensaio SSLs.

**Tabela 19: Resultados da fermentação acidogénica.**

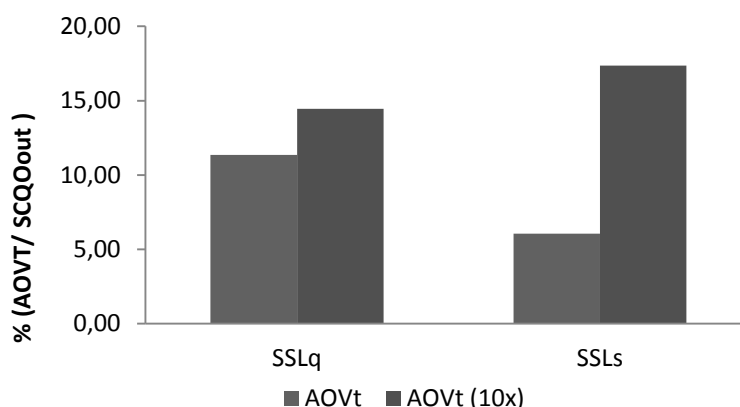
		SSLq <sub>10x</sub>	SSLs <sub>10x</sub>
$\Delta AOV_T$ (mgCQO/L)		3225	2742
HAc (mgCQO/L)		1319	1212
HPr (mgCQO/L)		1604	557,8
HBut (mgCQO/L)		300,7	972,5
$Y_{AOV}$ (gCQO/gCQO)		0,34	0,44
$Y_{AOV/S}$ (gCQO/gCQO)		2,76	3,66
$Y_{AOV/SSV_0}$ (gCQO/gSSV)		42,80	17,26
$r_{AOV}^1$ (mgCQO/L.h)		6,80	9,53
$r_{AOV}^2$ (mgCQO/L.h)		0,48	0,49
$q_{AOV} \times 10^3$ (gCQO/gSSV.h)		0,32	0,27
Composição AOVs (percentagem baseada em moles)	%HAc	44	60,23
	%HPr	47,25	17,18
	%HBut	8,75	22,6

Ao longo dos dois ensaios verificou-se que o pH, parâmetro não controlado, se manteve estável, perto de 7,0, ao longo do período fermentativo ao contrário do que se verificou nas experiências com 10x menos inóculo. O pH tem influência no tipo de ácidos formados e terá sido esta a razão para uma maior proporção de ácido propiónico obtido nos dois testes (Tabela 19). Este aumento foi mais acentuado no teste SSLq<sub>10x</sub> onde a co-predominância passou do HAc-HBut para HAc-HPr. No ensaio SSLs<sub>10x</sub>, a fracção de ácido propiónico aumentou mas não de forma

## Resultados e Discussão

significativa, mantendo-se o ácido acético (60,2%) como o ácido predominante. Bengtsson et al. (2008) verificaram que um aumento do valor de pH favorecia a produção de ácido propiónico, tendo como substrato efluente de fábrica de papel. Temudo et al. (2008) apenas detectaram formação de ácido propiónico nos valores perto de 7,0 em ensaios com glucose e xilose.

Um dos aspectos verificados na primeira bateria de testes foi a elevada carga orgânica que ainda resultou no final (SCQOout) da fermentação do resíduo. Os AOVs totais do SSLq e SSLs representam uma parcela de 12% e 6% do SCQOout respectivamente (Figura 15). Com o aumento de inóculo para 10x, a concentração de AOV totais na fracção final de SCQOout aumentou ligeiramente para 14,5% no SSLq<sub>10x</sub> e 17% no SSLs<sub>10x</sub> (Figura 15). O maior número de microrganismos consome maior quantidade de matéria recalcitrante aumentando o teor de AOVs na fracção solúvel final de CQO.



**Figura 15: Percentagem de AOVs na fracção de CQO solúvel no final da fermentação nas baterias com 1 e 10 gSSV/L.**

Conclui-se que o aumento de microorganismos aumenta a produção de AOVs, diminuindo o tempo de digestão dos açúcares no meio e aumentando a fracção de AOVs no SCQOout. Para trabalho futuro pode-se aplicar uma maior quantidade de lamas e tentar encontrar a melhor razão substrato: inóculo (gCQO/gSSV).

### 4.2.4 Efeito da carga orgânica

Com o objectivo de maximizar a produção de AOVs pretendeu-se testar o efeito do aumento da carga orgânica utilizada. Existem trabalhos na literatura que descrevem que aumentos de carga orgânica resultaram num aumento dos AOVs [66, 46]. Nos ensaios anteriores utilizou-se uma carga orgânica de 30 gCQO/L e nestes ensaios testaram-se os valores de 15, 25, 40 e 60gCQO/L. O substrato utilizado foi substrato da fracção SSLq, pois foi a que conduziu a

melhores rendimentos e produtividades em AOVs. A concentração de inóculo escolhida foi mantida a 1gSSV/L. As Figura 16 e Figura 17 apresentam a evolução dos AOV<sub>T</sub> e o respectivo pH da fermentação acidogénica das quatro cargas orgânicas ao longo de 20 dias.

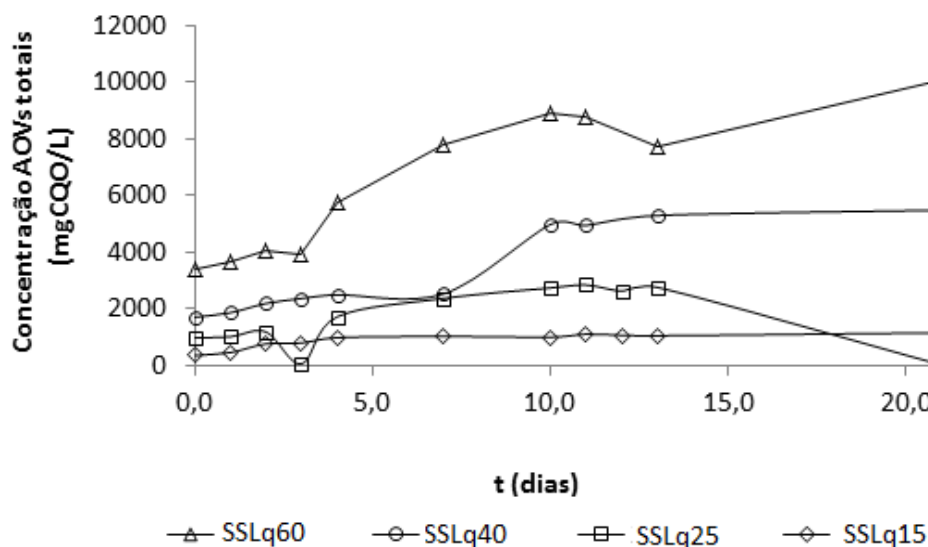


Figura 16: Resultados dos AOV<sub>T</sub> das várias cargas orgânicas aplicadas.

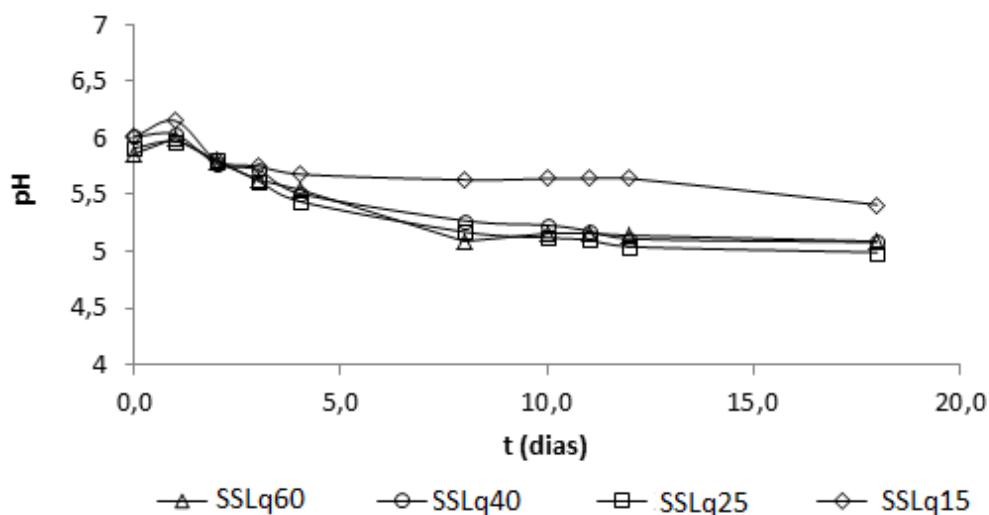


Figura 17: Variação do pH ao longo medido ao longo da fermentação.

De uma forma genérica denotou-se que quanto maior a carga orgânica fornecida, maiores as quantidades de AOVs formados. Este aumento da quantidade total de AOVs reflectiu-se nos valores de pH que chegaram perto de pH 5,0, isto para os valores de cargas orgânicas de 25, 40 e 60 mgCQO/L (Figura 17). Em termos de rendimentos-  $Y_{AOV}$  verificou-se um decréscimo com o



## Resultados e Discussão

aumento da carga orgânica aplicada, provavelmente devido ao facto de ter aumentado a concentração de compostos tóxicos para o consórcio microbiano. O rendimento de AOVs relativo aos açúcares iniciais ( $Y_{AOV/s}$ ) manteve-se superior a 1 gCQO/gCQO, mostrando tal como nos testes anteriores a utilização de outras fontes de carbono para além dos monómeros de açúcares iniciais. Os valores de rendimento inferiores ao SSLq podem-se justificar pelo facto de as lamas estarem armazenadas algum tempo, não se encontrando nas mesmas condições.

Quando se aumentou a carga orgânica de 15 e 25 gCQO/L para 60 gCQO/L a concentração de AOVs aumentam cerca de 800% e 370% respectivamente, um aumento bastante significativo visto a quantidade de lamas e tempo de fermentação ser o mesmo.

**Tabela 20: Resultados obtidos param as diferentes cargas orgânicas.**

		SSLq <sub>15</sub>	SSLq <sub>25</sub>	SSLq <sub>40</sub>	SSLq <sub>60</sub>	SSLq <sup>3)</sup>
$\Delta AOV_T$ (mgCQO/L)		804,3	1781	3781	6661	2521
HAc (mgCQO/L)		374,4	750,8	960,2	1699	628
HPr (mgCQO/L)		0	128,2	396,1	333,6	227
HBut (mgCQO/L)		429,9	864,6	2194	4261	1620
HLac (mgCQO/L)		0	0	645,6	368,8	0
$Y_{AOV}$ (gCQO/gCQO)		0,27	0,25	0,16	0,13	0,45
$Y_{AOV/s}$ (gCQO/gCQO)		1,08	1,12	1,19	1,15	1,51
$Y_{AOV/SSVo}$ (gCQO/gSSV)		0,80	1,78	3,78	6,66	2,52
$r_{AOV}^1$ (mgCQO/L.h)		10,17	11,24	20,73	37,06	11,4
$r_{AOV}^2$ (mgCQO/L.h)		1,86	4,12	8,75	13,22	3,64
$q_{AOV} \times 10^3$ (gCQO/gSSV.h)		0,50	1,66	1,81	1,80	1,19
<b>Composição AOVs (percentagem baseada em moles)</b>	%HAc	68,36	62,64	43,50	44,06	46,19
	%HPr	0	8,29	10,31	4,97	8,97
	%HBut	31,64	29,07	40,07	44,53	44,84
	%HLac	0	0	6,12	6,44	0

1- Consumo CQO rápido

2-Consumo CQO lento

3-SSL com 30gCQO/L de carga orgânica

Pela análise dos resultados da Tabela 20 verifica-se que a taxa de produção volumétrica de substrato de consumo rápido de CQO ( $r_{AOV}^1$ ) aumenta com o aumento da carga orgânica. Isto

era de esperar uma vez que a quantidade de açúcares iniciais também é superior. As taxas de produção volumétrica na fase de consumo de CQO lento ( $r_{AOV}^2$ ) diminuem, uma vez que cessa o consumo de açúcares, mas continua superior nas cargas orgânicas maiores obtendo-se 13,22 mgCQO/L.h no SSLq<sub>60</sub> contra 1,86, 4,12 e 8,75mgCQO/L do SSLq<sub>15</sub> SSLq<sub>25</sub> e SSLq<sub>40</sub> respectivamente.

Não só a quantidade de AOVs aumentou mas também o seu número. Enquanto nas baterias anteriores os AOVs obtidos foram apenas os três referidos anteriormente, neste caso, com o aumento da carga orgânica, ocorreu a formação de ácido láctico (HLac). Este ácido detectou-se nos ensaios SSLq<sub>40</sub> e SSLq<sub>60</sub> (Tabela 20). Em relação aos restantes ácidos, o ácido acético continua a ser produzido em maior quantidade e com percentagens superiores a 60% no caso do SSLq<sub>15</sub> e SSLq<sub>25</sub>. Nas cargas orgânicas superiores o ácido acético ronda os 40%, havendo uma co predominância entre o HAc-HBut, tal como acontece no SSLq (da primeira bateria de testes). Conclui-se que quanto maior a concentração de matéria-prima, maior a quantidade de substrato necessário para suprimir as necessidades energéticas da célula. Desta forma o microrganismo não tem necessidade de fermentar apenas os ácidos dos quais resultam moléculas de ATP da sua produção, como é o caso do ácido butírico e acético Figura 7. Tal como já tinha ocorrido anteriormente, conseguiram observar-se duas fases distintas na formação dos AOVs, a primeira durante o consumo de xilose e glucose, a segunda, após a sua exaustão.

Com estes resultados verificou-se que diferentes perfis de AOVs podem ser obtidos modificando a carga orgânica inicial. Os AOVs são precursores de vários produtos de valor acrescentado como por exemplo os bioplásticos. De acordo com Albuquerque et al. (2007) esta é uma estratégia interessante para a produção específica de um algum tipo de PHAs [40].

### 4.2.5 Estudo da inibição da Metanogénese

Nos ensaios anteriores foi usado o bromoetanossulfonato (BES) como inibidor da metanogénese de forma a maximizar a quantidade de AOVs formados. Apesar de se tratar de um inibidor específico, que afecta especificamente as metanoarqueas, não pode ser usado em grandes concentrações por questões ambientais, além de ser um composto caro. Nesta bateria de ensaios pretendeu-se analisar a potencialidade de outros inibidores metanogénicos que são mais económicos mas menos selectivos na sua acção.

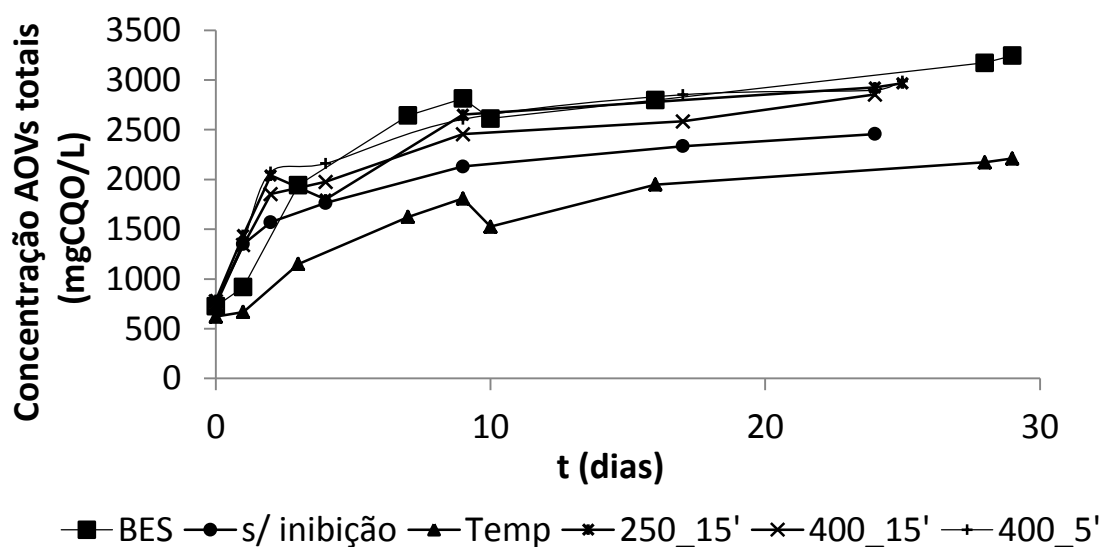
Neste ensaio, testou-se a temperatura, sendo este tratamento bastante utilizado para eliminar as bactérias que não têm capacidade de esporular (como as metanoarqueas) [67, 48]. O

## Resultados e Discussão

tratamento térmico foi aplicado nas lamas metanogénicas que foram depois colocadas no meio de fermentativo.

Testou-se ainda a alta pressão, tratamento aplicado na conservação dos alimentos em substituição dos tratamentos térmicos nos alimentos [51]. Pretendia-se verificar a possibilidade da alta pressão ter o mesmo efeito na inibição das metanoarqueas que a temperatura. As pressões escolhidas para esta fase de testes têm por base a Tabela 6 onde estão identificadas as pressões de inactivação de microorganismos, escolhendo-se 250MPa e 400MPa. A 250 MPa possivelmente seriam mais afectadas as bactérias Gram negativas, enquanto a 400MPa, seriam tanto as bactérias Gram positivas como microorganismos eucariotas. A 400MPa testaram-se dois tempos de pressurização diferentes 5 e 15 minutos, enquanto a 250 MPa pressurizou-se durante 15 min.

Incluiu-se ainda um ensaio em que não se adicionou qualquer inibidor de metanogénese como controlo. Os ensaios foram efectuados com uma carga orgânica de 30 gCQO/L de substrato, fracção SSLq e uma concentração inicial de cultura de 1 gSSV/L. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 18:



**Figura 18: Efeito dos diferentes tipos de supressores metanogénicos testados na quantidade total de AOVs na fermentação acidogénica da fracção SSLq.**

As maiores quantidades de AOVs foram obtidas nos ensaios efectuados com BES e alta pressão. A análise da fermentação acidogénica com as 3 pressões impostas mostrou que não existem diferenças na quantidade de AOVs totais obtidos, cerca de 2163 mgCQO/L (valor médio).

A quantidade de AOVs formados com a aplicação da pressurização foi de 2230 mg CQO/L (a 400MPa durante 15 min) um valor muito próximo do valor obtido com BES com 2521 mgCQO/L. Este é um resultado importante, uma vez que o BES é um composto caro e com restrições na sua aplicação, sendo apenas usado em reactores descontínuos [68]. A sua aplicação em reactores contínuos não é viável devido a fenómenos de *wash-out*. A alta pressão apresenta-se assim como uma boa alternativa ao BES, não só à escala laboratorial, mas também a escalas superiores, uma vez que se trata de um tratamento físico nas lamas e não uma solução que se aplica no meio fermentativo.

No ensaio com temperatura obteve-se menores quantidades de AOVs (1589 mgCQO/L) comparativamente à fermentação não sujeita a inibição (1715 mgCQO/L). Isto pode indicar que a temperatura terá afectado não só as metanoarqueas como todo o consórcio misto. Tal é indiciado pela taxa de produção volumétrica de consumo rápido de CQO com 5,97 mgCQO/L.h (inferior comparativamente às restantes como se pode constatar na Tabela 21).

**Tabela 21: Resultados obtidos para a inibição metanogénica.**

		250_15'	400_5'	400_15'	s/ inibição	BES	Temp
$\Delta AOV_T (mgCQO/L)$		2181	2230	2080	1715	2521	1589
$HAc (mgCQO/L)$		1211	917,8	1189	729,8	672,8	584,2
$HPr (mgCQO/L)$		0	0	0	751,9	227,5	294,3
$HBut (mgCQO/L)$		969,9	1312	891,5	232,8	1620,4	706,30
$Y_{AOV} (gCQO/gCQO)$		0,13	0,15	0,14	0,08	0,40	0,30
$Y_{AOV/S} (gCQO/gCQO)$		0,83	1,08	1,05	0,69	1,51	1,07
$Y_{AOV/SSV_0} (gCQO/gSSV)$		1,68	1,93	1,64	1,01	2,52	1,59
$r_{AOV}^1 (mgCQO/L.h)$		8,64	8,54	12,52	6,43	11,43	5,97
$r_{AOV}^2 (mgCQO/L.h)$		1,95	1,38	1,53	1,65	3,64	2,31
$q_{AOV} \times 10^3 (gCQO/gSSV.h)$		2,08	2,34	2,27	1,46	1,19	2,96
<b>Composição AOVs (percentagem baseada em moles)</b>	<b>%HAc</b>	75,60	63,44	76,34	56,66	46,19	56,49
	<b>%HPr</b>	0	0	0	15,28	8,97	16,21
	<b>%HBut</b>	24,40	36,56	23,66	28,07	44,84	27,30

Os ácidos produzidos nesta bateria de testes foram o ácido acético, n-butírico e o propiónico. O ácido predominante em todos os reactores é o ácido acético, chegando a 76% no SSLq<sub>400 MPa\_15</sub>. Verificou-se também que não houve formação de ácido propiónico nos ensaios com alta pressão.

### 4.2.6 Bambu proveniente de fitorremediação

O segundo dos resíduos industriais analisados foi o bambu cedido pela empresa COBELGAL. Da sua aplicação em fitorremediação resultam grandes quantidades de biomassa lenhocelulósica sem grande utilidade. Um dos problemas que surge é o facto de se tratar de biomassa bastante recalcitrante que resiste a ataque de microorganismos e a processos enzimáticos. O bioprocessamento deste tipo de matéria necessita por isso de um pré-tratamento e, neste trabalho, escolheu-se, o *steam explosion* (SE): Este processo tem sido extensivamente usado para tornar mais eficiente a digestão anaeróbia de resíduos celulósicos [37, 63, 69].

Nesta bateria de testes foi utilizado como substrato bambu pré-tratado com SE ( $B_{SE}$ ) e bambu submetido a SE seguido de tratamento em NaOH ( $B_{NaOH}$ ). O tratamento com NaOH teve como objectivo aumentar a porosidade do material devido à disrupção da lenhina por separação das ligações estruturais entre a lenhina e os carboidratos. Desta forma, aumenta-se a área interna superficial do material, havendo uma disrupção da lenhina aumentando assim a porosidade. Como se trata de um material sólido, mais recalcitrante e como se verificou no ‘estudo do aumento das lamas’ que maior quantidade de cultura mista aumenta o rendimento de AOVs, utilizou-se uma concentração intermédia de lamas de 2,5 gSSV/L de inóculo. Como não foi possível determinar o CQO deste resíduo sólido utilizaram-se 20 gSV/L de substrato (condições descritas na Tabela 12 do capítulo 3)

A Figura 19 e Figura 20 apresentam a evolução da acidificação dos dois resíduos durante 27 dias de operação:

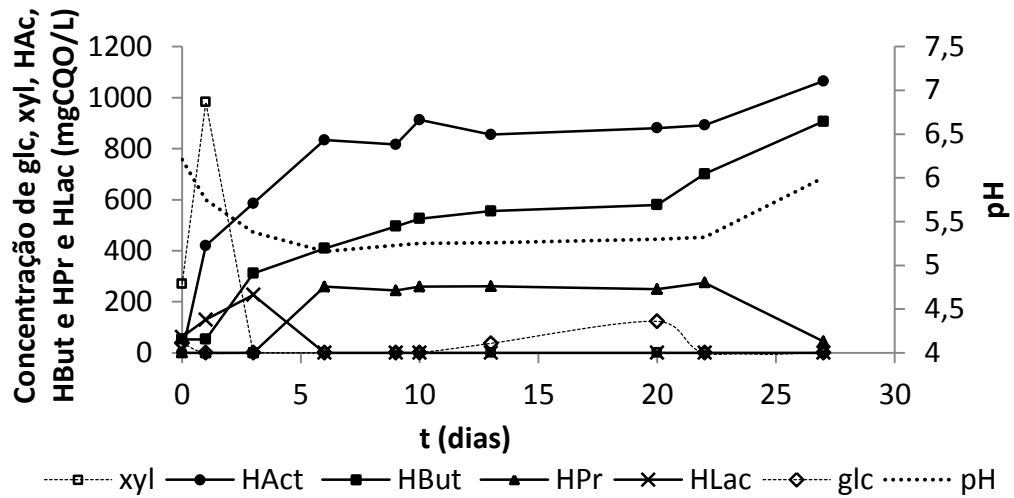


Figura 19: Fermentação acidogénica do bambu com SE ( $B_{SE}$ )

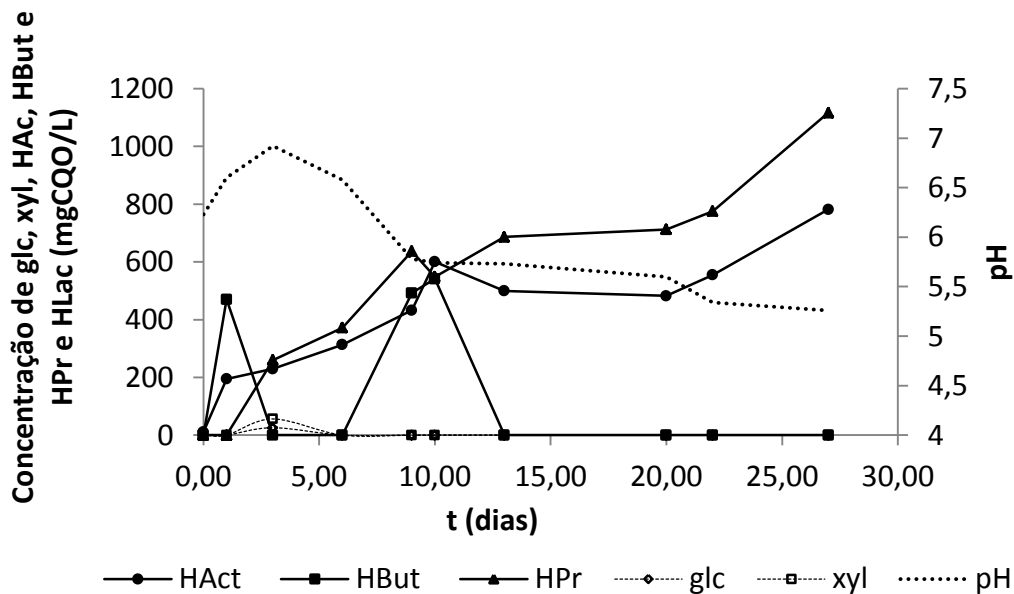


Figura 20: Fermentação acidogénica do bambu com os dois pré-tratamentos ( $B_{NaOH}$ ).

A obtenção de AOVs a partir do bambu foi bem-sucedida. No caso do  $B_{SE}$ , a concentração de açúcares iniciais era baixa, verificando-se uma subida de xilose no segundo dia de digestão e ligeiras subidas da glucose nos dias seguintes o que demonstra que as enzimas das bactérias hidrolíticas conseguiram quebrar as ligações dos oligómeros de celulose e hemicelulose,

## Resultados e Discussão

---

fornecendo os açúcares simples às bactérias fermentativas. É de referir que, ao contrário das baterias do HSSL, a primeira fase de formação de AOVs foi mais rápida com o bambu, provavelmente pela concentração inferior de inibidores fenólicos que se encontram em quantidades consideráveis no efluente da unidade fabril da pasta de papel. Relativamente ao  $B_{NaOH}$  não foi detectada qualquer quantidade de açúcar inicial, apenas uma ligeira subida residual da glucose. Mas tal como no ensaio com  $B_{SE}$  o teor de AOVs aumentou ao longo do tempo indiciando o consumo dos polissacarídeos constituintes do bambu.

Em termos de AOVs totais formados, obtiveram-se 2193 mgCQO/L no ensaio com  $B_{SE}$  enquanto a partir do  $B_{NaOH}$  produziu-se um pouco menos, 1887 mgCQO/L. Calcularam-se tal como para o HSSL, duas taxas de produtividade volumétrica (Tabela 22). Na primeira a fase mais rápida de formação de AOVs (considerando o dia 13) e na segunda a formação mais lenta destes (dia 20 a 27). Verificaram-se valores semelhantes nos dois ensaios ente 4 e 5 mgCQO/L.h, para o  $B_{NaOH}$  e  $B_{SE}$  respectivamente. Na segunda fase de produção de AOVs houve diminuição do  $r_{AOV}$  no ensaio com  $B_{SE}$  de 5,14 para 3,18 mgCQO/L.h, enquanto no ensaio com substrato  $B_{NaOH}$  se manteve praticamente igual, mostrando a influência do pré-tratamento alcalino (aumento da área superficial facilitando o acesso das enzimas à celulose), o que mantém a potencialidade de fermentação por mais tempo. Contrariamente ao esperado, com dois pré-tratamentos aplicados ao bambu ( $B_{NaOH}$ ) não se obtém uma maior quantidade de AOVs. A explicação pode estar no hidrolisado resultante do tratamento alcalino da biomassa. Parte dos polissacarídeos presentes solubilizaram na solução alcalina, o que explica também o facto de não se detectar açúcares no início da fermentação.

Comparando estes resultados com o SSLq da primeira fase de testes (o melhor resultado das três fracções de HSSL) as quantidades finais de AOVs foram semelhantes. No SSLq obteve-se 2521 mgCQO/L enquanto no  $B_{SE}$  esse valor foi 2193 mgCQO/L. Os rendimentos não são possíveis de comparar pois a carência química de oxigénio não foi calculada para os substratos sólidos (o método usado para o HSSL não pode ser aplicado a matéria sólida).

Tabela 22: Resultados da fermentação com bambu.

		B <sub>SE</sub>	B <sub>NaOH</sub>
$\Delta AOV_T$ (mgCQO/L)		2193	1886,9
HAc (mgCQO/L)		1064	770,3
HPr (mgCQO/L)		44,95	1116
HBut (mgCQO/L)		853,9	0
$Y_{AOV/SSVo}$ (gCQO/gSSV)		0,09	0,00
$r_{AOV}^1$ (mgCQO/L.h)		5,14	4,31
$r_{AOV}^2$ (mgCQO/L.h)		3,18	4,29
Composição AOVs (percentagem baseada em moles)	%HAc	74,21	54,56
	%HPr	1,80	45,44
	%HBut	23,99	0

1)Taxa produção volumétrica calculada até dia 13

2)Taxa produção volumétrica calculada do dia 20 ao 27

Tal como no HSSL (baterias de testes com carga orgânica inferior a 30gCQO/L) os ácidos formados nestes substratos foram o ácido acético o n-butírico e o propiónico. O B<sub>SE</sub> originou maior quantidade de ácido acético e ácido butírico e no B<sub>NaOH</sub> existiu uma co-predominância entre ácido propiónico e o ácido acético (Tabela 22). A formação do ácido propiónico em vez do ácido butírico foi favorecida pelo aumento de pH devido ao pré-tratamento alcalino, aumentando assim o teor deste ácido.

#### 4.2.7 Engaço de uva

Engaço, tal como o bambu, é um resíduo sólido que necessita de pré-tratamento para tornar mais acessíveis os monossacarídeos de modo a que a fermentação ocorra. O SE foi o pré-tratamento aplicado. As diferenças em termos de composição não são aqui referidas por serem objecto de estudo noutro trabalho. Pode-se afirmar que de uma forma geral, o efeito do SE não foi tão significativo como no bambu, em relação à diminuição de lenhina e aumento de extractáveis em acetona.



## Resultados e Discussão

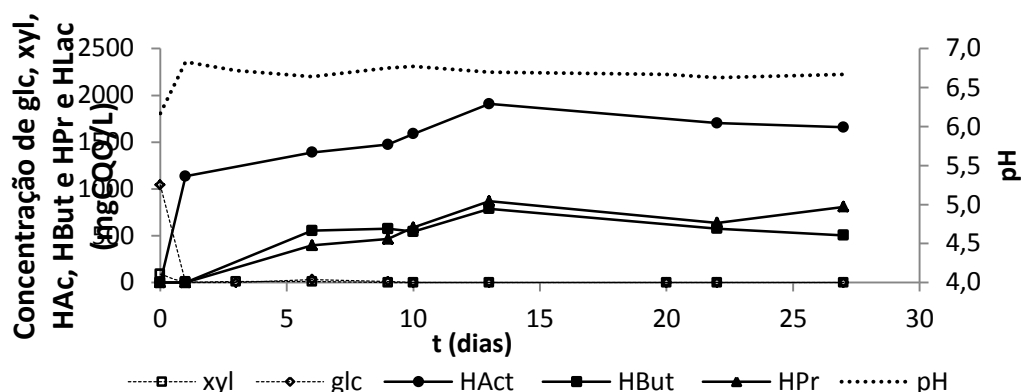


Figura 21: Fermentação acidogénica do engaço ao longo do tempo

No engaço, contrariamente ao bambu, foi possível detectar uma quantidade inicial de glicose considerável (cerca de 1gCQO/L) que foi imediatamente convertida em ácido acético como se pode observar na Figura 21. Apesar do acerto inicial do pH para 6,0 este foi aumentando ao longo do tempo mantendo-se praticamente constante e perto de pH 6,7 a partir do dia 3.

Em termos de taxa de produção volumétrica repara-se que o valor é negativo (-1,98 mgCQO/L.h) o que mostra uma diminuição dos AOVs a partir do dia 13. Estes estão a ser consumidos pela formação pelo consórcio de lamas, o que pode justificar o gás observado na seringa quando se procedia a amostragens deste reactor.

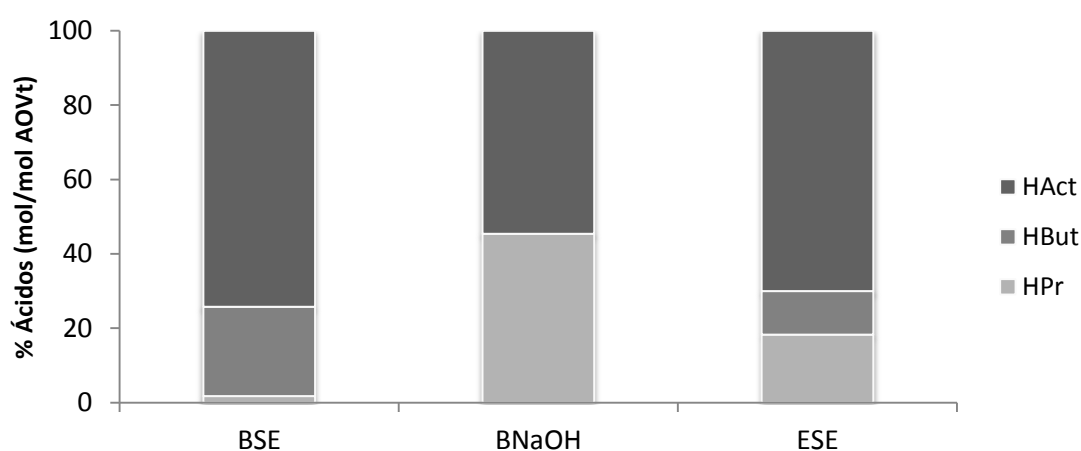
Tabela 23: Fermentação acidogénica do engaço de uva.

		E <sub>SE</sub>
$\Delta AOV_T$ (mgCQO/L)		3566
HAc (mgCQO/L)		1908
HPr (mgCQO/L)		868,9
HBut (mgCQO/L)		788,42
$Y_{AOV/SSV_0}$ (gCQO/gSSV)		0,09
$r_{AOV}^1$ (mgCQO/L.h)		9,85
$r_{AOV}^2$ (mgCQO/L.h)		-1,98
Composição AOVs (percentagem baseada em moles)	%HAc	70,02
	%HPr	18,32
	%HBut	11,66

1) Taxa produção volumétrica calculada até dia 13

2) Taxa produção volumétrica calculada do dia 13 ao dia 27

Em relação à quantidade total de AOVs formados, o engaço permitiu obter maiores quantidades (3566 mgCQO/L) que o melhor resultado com o bambu ( $B_{SE}$  com 2193 mgCQO/L) até ao dia 13. No entanto, ao longo do tempo de fermentação, no ensaio com bambu a quantidade de AOVs aumentou, enquanto no engaço começou a diminuir a meio da fermentação. Esta diferença pode ser explicada pelo pH, pois no ensaio com engaço, manteve-se perto de 7,0, enquanto nos ensaios com bambu, o pH foi para valores mais baixos. De acordo com Wang et al. 2010, a pH mais alto as bactérias metanogénicas tem mais propensão a se desenvolver convertendo os AOVs em metano.



**Figura 22: Percentagem molar de cada ácido em relação aos ácidos totais formados.**

A Figura 22 mostra o perfil de AOVs obtidos no final de 27 dias de fermentação, verificou-se que o mesmo substrato (bambu) com pré-tratamento diferente origina um perfil de AOVs distinto. Peng-Guo et al (2011) estudaram vários pré-tratamentos com palha de milho entre eles o *steam explosion* obtendo 2,99g/L de AOVs. Convertendo as unidade de concentração para g/L verifica-se que o  $B_{SE}$  obteve 1,53 g/L, o  $B_{NaOH}$  1,47 g/L e o  $E_{SE}$  2,36 g/L. Estes resultados mostram que é possível a produção de AOVs a partir de resíduos industriais sólidos, com pouco ou nenhum valor económico. Consoante as condições de bioprocessamento é possível originar perfis de AOVs distintos.

### 4.3 Caracterização molecular do consórcio microbiano

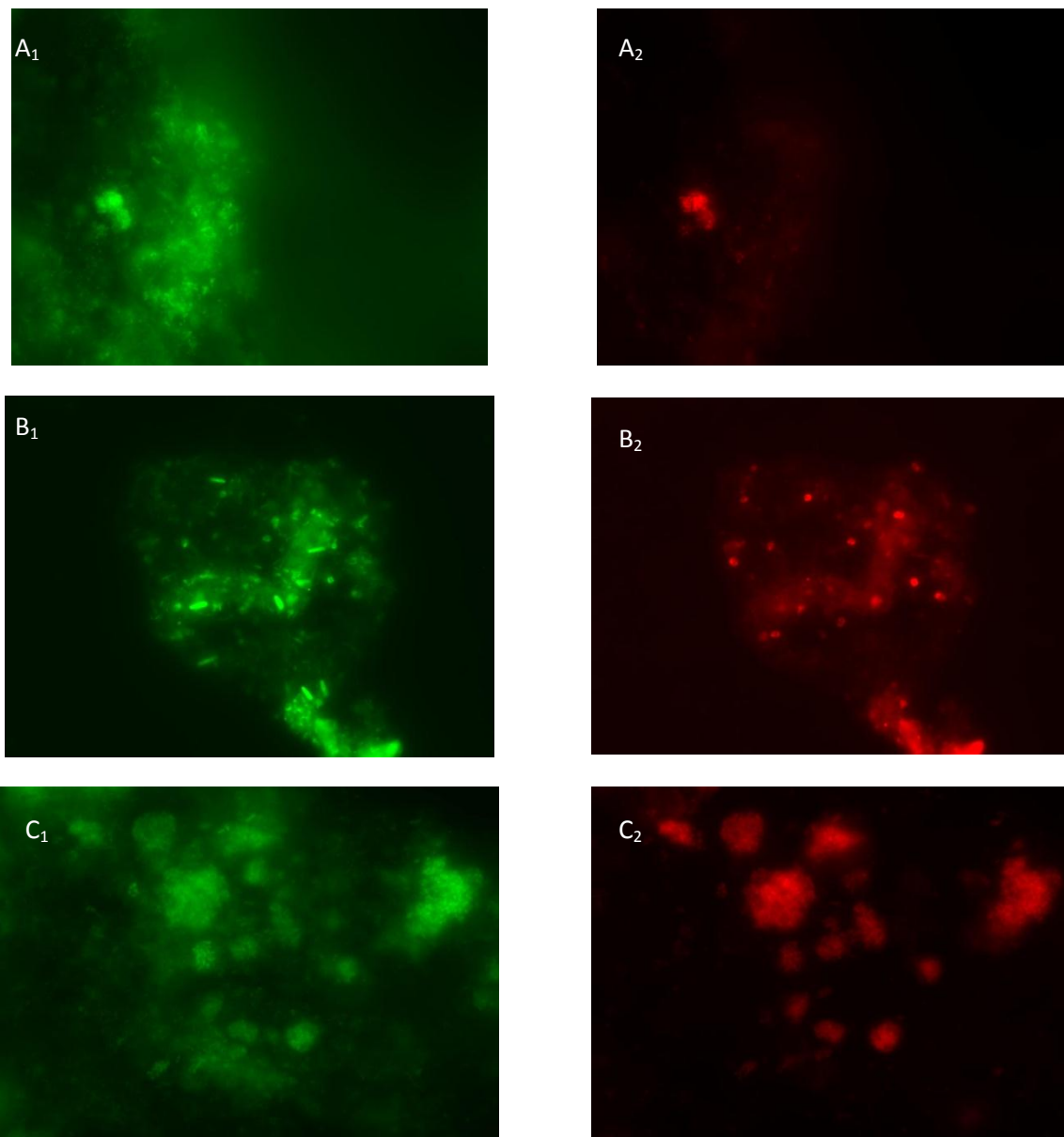
A caracterização com a técnica hibridização fluorescente “in situ” (FISH, *fluorescence “in situ” hybridization*) foi realizada nas lamas resultantes da fermentação com HSSL da primeira bateria de testes (concretamente a fracção SSLq). Foram utilizadas as sondas EUBmix que detecta

## Resultados e Discussão

---

a maioria das bactérias e sondas específicas para as classes  $\alpha$ - $\beta$  e  $\gamma$ - proteobacterias e para os gêneros *Thauera* e *Azoarcus* (ver Tabela 25 em anexo B).

A biomassa presente na amostra analisada hibridizou positivamente com as sondas das *eubactéria*, das classes  $\alpha$ - e  $\gamma$ -proteobacterias e do gênero *Thauera*.



**Figura 23:** Resultados de FISH para as sonda EUBmix (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>) e para as sondas correspondentes às classes  $\alpha$ - e  $\gamma$ -proteobactérias (A<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>) e ao gênero *Thauera* (C<sub>2</sub>).

Analisando as imagens da Figura 23 A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> verifica-se que hibridizaram positivamente com a sonda das  $\alpha$ -proteobactérias sobretudo bactérias filamentosas e dois tipos de bastonetes com dois tipos de espessuras distintas. Com a sonda das  $\gamma$ -proteobactérias (figura B<sub>2</sub>) observaram-se sinais positivos principalmente de bactérias com a forma de cocabacilos.. A sonda correspondente

ao género *Azoarcus* não permitiu observar qualquer hibridização, mas para o género *Thauera*, foram verificados resultados positivos (figura C<sub>2</sub>). Este género é caracterizado pela habilidade de consumir compostos aromáticos em condições anaeróbias [70], podendo indiciar a presença de organismos capazes de consumir compostos fenólicos existentes no HSSL. Exemplo desses compostos são os lenhossulfonatos que diminuem ao longo da fermentação, como se constatou na primeira bateria de testes para as três fracções de HSSL estudadas. Como este género é uma  $\beta$ -proteobactérias confirmou-se assim a presença desta classe no inóculo.



## Capítulo 5 - Conclusão

---

Neste trabalho propôs-se valorizar subprodutos industriais, o HSSL da indústria da pasta de papel, o engaço de uva e o bambu de fitorremediação, através da produção de AOVs a partir de fontes renováveis utilizando digestão anaeróbia.

O processo de acidificação do HSSL mostrou a necessidade de um pré-tratamento ao resíduo devido às quantidades de compostos inibidores presentes, como os derivados fenólicos, que impossibilitaram a utilização dos açúcares presentes para a produção de AOVs. Os melhores resultados foram obtidos com a fracção que resultou do pré-tratamento químico e com a fracção obtida após o processo de produção de bioetanol. Nesta última um rendimento AOVs/açúcares de 3,85 gCQO/gCQO. Isto mostrou que a utilização de outras fontes de carbono para além dos açúcares simples como os XOS e os LS.

A análise de FISH mostrou a presença de microrganismos pertencentes ao género *Thauera* caracterizados pela capacidade de consumir compostos aromáticos em condições anaeróbias. Os AOVs formados foram o ácido propiónico, ácido butírico e o acético, obtendo-se percentagens de AOVs diferentes consoante a fracção em causa. Para o SSL a proporção de HAc:HPr:HBut foi de 90:4:6, enquanto no SSLq houve co-predominância entre o butírico e o acético com 46:9:45. Já o SSLs o acético foi o ácido predominante 83:10:7. Quaisquer umas das misturas apresenta a possibilidade de ser utilizada como substrato para a produção de PHA por culturas mistas. Os resultados obtidos mostraram a potencialidade de integrar vários bioprocessos em série para a valorização do HSSL, produzindo-se proteína microbiana, bioetanol e AOVs.

Após confirmação do potencial acidogénico das várias fracções de HSSL estudaram-se estratégias para maximização da produção de AOVs como o efeito da concentração das lamas e o efeito da carga orgânica (CQO). O aumento da concentração de inoculo (10gSSV/L) levou a um aumento da concentração de AOV<sub>T</sub> de 4x mais no SSLq e de quase 2x para o SSLs. Este aumento deveu-se ao consumo rápido dos monómeros (2 a 3 dias face aos 10 dias da bateria de testes análoga com 1gSSV/L). Foi verificado um aumento de AOV<sub>T</sub> na fracção final de CQO (SCQOout) que mostra um maior consumo de substratos como os XOS e os LS. No que diz respeito ao perfil de ácidos houve mudanças efectivas nas proporções havendo um aumento significativo de ácido

## Conclusão

---

propiónico no caso do SSLq<sub>10x</sub> onde a co-predominância passou a ser entre HAc-HPr (56:39:5). No SSLs<sub>10x</sub> o acético continuou a ser o ácido mais produzido (60:17:23).

Relativamente ao efeito da carga orgânica constatou-se que o aumento da concentração da carga de 15g CQO/L para 60gCQO/L leva a um aumento de 800% nos AOV<sub>T</sub>. Não só dos AOV<sub>T</sub> aumentaram com a carga orgânica. Houve também um aumento do número de ácidos presentes no meio, surgindo o HLaC nas maiores cargas orgânicas (SSLq<sub>40</sub> e SSLq<sub>60</sub>). Em termos de proporções obteve-se a mesma co-predominância entre HAc-HBut nos quatro testes tal como acontece com SSLq (30gCQO/L e 1gSSV/L de lamas).

A última estratégia estudada foi o tipo de inibidores de bactérias metanogénicas. Foram testados supressores como BES, a temperatura e a alta pressão (APH) (nunca testado na literatura como inibidor metanogénico). As maiores quantidades de AOVs obtido foram dos ensaios com BES e AP (2521 mgCQO/L e 2230mgCQO/L, respectivamente). Este resultado mostra que o BES, um inibidor e com restrições ambientais, pode ser substituído pela AP. O uso da temperatura resultou numa produção de AOVs inferior ao meio sem inibição (1589 mgCQO/L e 1715 mgCQO/L, respectivamente), mostrando a desvantagem de ser um inibidor que também afecta as populações acidogénicas.

Por fim verificou-se que o *steam explosion* é um pré-tratamento eficaz na disrupção da estrutura da biomassa lenhocelulósica, como o bambu e o engaço de uva, permitindo uma produção de AOVs de 2193, 1886 e 3566 mgCQO/L para o B<sub>SE</sub> B<sub>NaOH</sub> e E<sub>SE</sub>, respectivamente. Em termos de proporções de AOVs obteve-se um perfil de AOVs distinto consoante o pré-tratamento usado. Enquanto no B<sub>SE</sub> o perfil é 74:12:24 (HAc:HPr:HBut) para o bambu pré-tratado também com solução alcalina (B<sub>NaOH</sub>) 55:45:0 foram os AOVs encontrados. Por último o E<sub>SE</sub> foi único substrato sólido que permitiu produzir os três ácidos orgânicos como nas fracções de HSSL.

Em suma, este trabalho mostrou que é possível produzir AOVs a partir de resíduos industriais sólidos e de diferentes efluentes de HSSL, utilizando um processo biológico simples, viável e económico, como é a digestão anaeróbia. Os resultados obtidos levantam a hipótese de se poder manipular o perfil de AOVs obtidos, modificando as condições de operação e o tipo de substrato.

### 5.1 Trabalho Futuro

Como trabalho futuro propõem-se a continuação dos estudos de acidificação complementando resultados de algumas baterias como:

- Aumentar carga orgânica no HSSL até condições limitantes;
- Verificar as melhores razão substrato: inoculo (gCQO/gSSV);
- Estudar outros inibidores metanogénicos como o clorofórmio (afecta as metanogénicas e as sulfato redutoras);
- Testar outras pressões ou ciclos de pressão no tratamento do inóculo para a supressão metanogénica;
- Avaliar a influência do pH;
- Fermentar resíduos sólidos sem pré-tratamento (comparar com *steam explosion*).
- Utilizar o solvente acetona como pré-tratamento do bambu com *steam explosion*, uma vez que se verificou uma enorme solubilização dos extractáveis nesta fracção (onde se encontram compostos fenólicos, possíveis compostos inibitórios da fermentação);
- Testar a utilização de bentonite (segundo Dionisi et al (2005) aumenta a produção de AOVs);
- Verificar a existência de metanoarqueas nos inóculos resultantes dos testes de supressão metanogénica dos vários inibidores.
- Aproveitar hidrolisado de NaOH (possibilidade de conter um grande numero de açúcares solubilizados);
- Testar o efluente da produção de bioetanol com as células de *S. stipitis* presente como fonte de carbono às bactérias fermentativas nas próximas experiências;
- Determinar quais os monómeros e o tamanho de LS que são preferencialmente degradados;
- Alimentar culturas mistas produtoras de PHAs com as misturas de AOVs obtidas;
- Testar as melhores condições operacionais em reactor contínuo.





## Capítulo 6 -Bibliografia

---

1. Carrez, D., (2010). "Industrial biotechnology: A powerful, innovative technology to mitigate climate change". Consultado em: 5 de Outubro de 2010; disponível em: <http://www.innovationeu.org/news/innovation-eu-vol2-1/0262-industrial-biotechnology.html>.
2. Zhang, Y.H. (2008). "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries". Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. **35**(5): 367-375.
3. Riebeek, H., (2011). "The Carbon Cycle". Consultado em: 17 Outubro de 2011; disponível em: [http://earthobservatory.nasa.gov/Features/CarbonCycle/carbon\\_cycle2001](http://earthobservatory.nasa.gov/Features/CarbonCycle/carbon_cycle2001).
4. Yang, S.-T., (2007). Bioprocessing for value-added products from renewable resources.
5. COTEC, (2006). ViaBio-Biotecnologia e Inovação na Indústria Portuguesa- estudo de Oportunidades Tecnológicas e de Mercado., 38-62.
6. Harasym, J., (2011) "Biorefining and biorefineries – industry of future ".
7. Chang, H., Kim, N.-J., Kang, J., and Jeong, C. (2010). "Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals". Biotechnology and Bioprocess Engineering. **15**(1): 1-10.
8. Carneiro, F., Duarte, L.C., and Gírio, F.M. (2008). "Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments". Journal of Scientific & Industrial Research. **67**(1): 849-864.
9. Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., and Levin, D.B. (2011). "Biomass pretreatment: Fundamentals toward application". Biotechnology Advances. **29**(6): 675-685.
10. Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., and Soccol, V.T. (2000). "Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse". Bioresource Technology. **74**(1): 69-80.
11. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., and Negro, M.J. (2010). "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review". Bioresource Technology. **101**(13): 4851-4861.
12. Ding, S.-Y. and Himmel, M.E. (2006). "The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization". Journal of Agricultural and Food Chemistry. **54**(3): 597-606.
13. DOE, U., (2011). "Cellulose Structure and Hydrolysis Challenges". Consultado em: 16 Novembro de 2011; disponível em: <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181&topic=53&citation=&general=&restsection=public>.
14. Smook, G.A., (2002). Handbook for pulp & paper technologists: Angus Wilde Publications.

15. Pereira, S.R., Ivanuša, Š., Evtuguin, D.V., Serafim, L.S., and Xavier, A.M.R.B. (2011). "Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: a way to boost the production of second generation bioethanol". Bioresource Technology. **101**(1):131-135
16. Melo, M. and Gouveia, M., (2001). Pasta e papel em Portugal – Perspectivas para o sector. Gabinete de Estatística e Planeamento da Educação.
17. Fernandes, D., Pereira, S.R., Leal, L.A.S.S., Evtugin, D.V., and Xavier, A.M.R.B., (2012). Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor, Marco A.P. Lima (Ed.), ISBN 979-953-307-007-9 (In Press).
18. Nigam, J.N. (2001). "Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*". Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. **26**(3): 145-150.
19. Parajó, J.C., Domínguez, H., and Domínguez, J.M. (1997). "Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents". Process Biochemistry. **32**(7): 599-604.
20. Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., and Almeida E Silva, J.B. (2006). "Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*". Enzyme and Microbial Technology. **40**(1): 17-24.
21. Marques, A.P., Evtuguin, D.V., Magina, S., Amado, F.M.L., and Prates, A. (2009). "Structure of Lignosulphonates from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of *Eucalyptus globulus*". Journal of Wood Chemistry and Technology. **29**(4): 337-357.
22. Santos, S.G., Marques, A.P., Lima, D.L.D., Evtuguin, D.V., and Esteves, V.I. (2010). "Kinetics of Eucalypt Lignosulfonate Oxidation to Aromatic Aldehydes by Oxygen in Alkaline Medium". Industrial & Engineering Chemistry Research. **50**(1): 291-298.
23. Pontes, A.S.N., (2008). "Bioprocessamento de pentoses do licor de cozimento ao sulfito ácido". Dissertação de mestrado Departamento de Química-Universidade de Aveiro Aveiro
24. Marques, A.P., Evtuguin, D.V., Magina, S., Amado, F.M.L., and Prates, A. (2009). "Chemical Composition of Spent Liquors from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of *Eucalyptus globulus*". Journal of Wood Chemistry and Technology. **29**(4): 322-336.
25. Barros, A.C., (2007). "Estudos sobre o potencial do bambu *Guadua angustifolia* Kunz para a fitorremediação dos metais pesados zino e cádmio". Pós-graduação em Química e Biotecnologia, Instituto de Química e Biotecnologia-Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
26. Yue, Z.-B., Yu, H.-Q., Harada, H., and Li, Y.-Y. (2007). "Optimization of anaerobic acidogenesis of an aquatic plant, *Canna indica* L., by rumen cultures". Water Research. **41**(11): 2361-2370.
27. Duarte, L.C., (2007). Os subprodutos agro-industriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa. Revista de Engenharia Química. Publindústria, Produção de Comunicação, Lda **5**, 56-62.

28. Prozil, S.O., (2008). "Caracterização química do engaço da uva e possíveis aplicações". Tese Mestrado, Departamento de Química-Universidade de Aveiro, Aveiro.
29. Zhang, Y.-H.P. and Lynd, L.R. (2004). "Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems". Biotechnology and Bioengineering. **88**(7): 797-824.
30. Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S.M., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A.M., Evtuguin, D.V., and Bezerra, R.M.F. (2010). "Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi". Bioresource Technology. **101**(15): 6045-6050.
31. Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., and Stroeve, P. (2009). "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production". Industrial & Engineering Chemistry Research. **48**(8): 3713-3729.
32. Alves, M., (2007). Reactores para tratamento Anaeróbio", Reactores Biológicos-Fundamentos e Aplicações. Lisboa: Lidel.
33. Silva, F.G.C.S., (2007). "Modelização dinâmica do processo de digestão anaeróbia utilizando o modelo ADM1". Tese Mestrado Departamento de Ambiente e Ordenamento-Universidade de Aveiro, Aveiro.
34. Hansen, K.H., Angelidaki, I., and Ahring, B.K. (1998). "Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia". Water Research. **32**(1): 5-12.
35. Lettinga, G. (2008). "Towards feasible and sustainable environmental protection for all". Aquatic Ecosystem Health & Management. **11**(1): 116-124.
36. Ganesh, P.S., Sanjeevi, R., Gajalakshmi, S., Ramasamy, E.V., and Abbasi, S.A. (2008). "Recovery of methane-rich gas from solid-feed anaerobic digestion of ipomoea (*Ipomoea carnea*)". Bioresource Technology. **99**(4): 812-818.
37. Datar, R., Huang, J., Maness, P.-C., Mohagheghi, A., Czernik, S., and Chornet, E. (2007). "Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process". International Journal of Hydrogen Energy. **32**(8): 932-939.
38. Verma, V.K., Singh, Y.P., and Rai, J.P.N. (2007). "Biogas production from plant biomass used for phytoremediation of industrial wastes". Bioresource Technology. **98**(8): 1664-1669.
39. Ruel, S.M., Comeau, Y., Héduit, A., Deronzier, G., Ginestet, P., and Audic, J.M. (2002). "Operating conditions for the determination of the biochemical acidogenic potential of wastewater". Water Research. **36**(9): 2337-2341.
40. Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., and Reis, M.A.M. (2007). "Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses". Journal of Biotechnology. **130**(4): 411-421.
41. Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., and Welander, T. (2008). "Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production". Biochemical Engineering Journal. **40**(3): 492-499.

42. Arudchelvam, Y., Perinpanayagam, M., and Nirmalakhandan, N. (2010). "Predicting VFA formation by dark fermentation of particulate substrates". Bioresource Technology. **101**(19): 7492-7499.
43. Chen, Y., Cheng, J.J., and Creamer, K.S. (2008). "Inhibition of anaerobic digestion process: A review". Bioresource Technology. **99**(10): 4044-4064.
44. Canilha, L., Milagre, A., Silva, S., Silva, J., and Rocha, G.J., (2010). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia "desconstrução" da fibra vegetal. Revista Analytica: Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de Lorena. Eskalab, 48-53.
45. Lv, W., Schanbacher, F.L., and Yu, Z. (2010). "Putting microbes to work in sequence: Recent advances in temperature-phased anaerobic digestion processes". Bioresource Technology. **101**(24): 9409-9414.
46. Aquino, S.F.d. and Chernicharo, C.A.L. (2005). "Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle". Engenharia Sanitaria e Ambiental. **10**: 152-161.
47. Temudo, M., Mato, T., Kleerebezem, R., and van Loosdrecht, M. (2009). "Xylose anaerobic conversion by open-mixed cultures". Applied Microbiology and Biotechnology. **82**(2): 231-239.
48. Poggi-Varaldo, H., Reyes, A., Pineda-Cruz, J., and Méndez, S., (2008). Avance y perspectivas de los procesos biológicos fermentativos para la obtención de H<sub>2</sub> de residuos sólidos municipales e industriales. Libros de Ciencia y Tecnología N° 1, México México (Ecatepec). 146-163.
49. Logan, B.E., Oh, S.-E., Kim, I.S., and Van Ginkel, S. (2002). "Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers". Environmental Science & Technology. **36**(11): 2530-2535.
50. Lay, J.-J., Lee, Y.-J., and Noike, T. (1999). "Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste". Water Research. **33**(11): 2579-2586.
51. Lavinas, F.C., Lopes, M.L.M., and Mesquita, V.L.V., (2007). Efeito da alta pressão hidrostática sobre a inativação de microorganismos: América do Norte.
52. Torrezan, R. (2003). "Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos cárneos". B.CEPPA. **21**(2): 249-266.
53. Yuan, Q., Sparling, R., and Oleszkiewicz, J.A. (2011). "VFA generation from waste activated sludge: Effect of temperature and mixing". Chemosphere. **82**(4): 603-607.
54. Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., and Itävaara, M. (2000). "Biodegradation of lignin in a compost environment: a review". Bioresource Technology. **72**(2): 169-183.
55. Dionisi, D., Carucci, G., Papini, M.P., Riccardi, C., Majone, M., and Carrasco, F. (2005). "Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers". Water Research. **39**(10): 2076-2084.
56. Anil Kumar, P.K., Shamala, T.R., Kshama, L., Prakash, M.H., Joshi, G.J., Chandrashekar, A., Latha Kumari, K.S., and Divyashree, M.S. (2007). "Bacterial synthesis of poly(hydroxybutyrate- co-hydroxyvalerate) using carbohydrate-rich mahua (Madhuca sp.) flowers". Journal of Applied Microbiology. **103**(1): 204-209.

57. Bengtsson, S., Pisco, A.R., Reis, M.A.M., and Lemos, P.C. (2010). "Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms". Journal of Biotechnology. **145**(3): 253-263.
58. Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., and Welander, T. (2008). "Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater". Bioresource Technology. **99**(3): 509-516.
59. Ntaikou, I., Kourmentza, C., Koutrouli, E.C., Stamatelatou, K., Zampraka, A., Kornaros, M., and Lyberatos, G. (2009). "Exploitation of olive oil mill wastewater for combined biohydrogen and biopolymers production". Bioresource Technology. **100**(15): 3724-3730.
60. Prozil, S.O., Evtuguin, D.V., and Lopes, L.P.C. (2012). "Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces". Industrial Crops and Products. **35**(1): 178-184.
61. Neto, C.P. (1996). "Chemical composition and structural features of the macromolecular components of *Hibiscus cannabinus* grown in Portugal.". Industrial Crops and Products. **5**(3): 186-196.
62. Browning, B.L., (1967). *Methods in Wood Chemistry*. New York, USA: John Wiley & Sons.
63. Wang, J., Yue, Z.-B., Chen, T.-H., Peng, S.-C., Yu, H.-Q., and Chen, H.-Z. (2010). "Anaerobic digestibility and fiber composition of bulrush in response to steam explosion". Bioresource Technology. **101**(17): 6610-6614.
64. Mussatto, S.I. and Roberto, I.C. (2004). "Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review". Bioresource Technology. **93**(1): 1-10.
65. Kortekaas, S., Vidal, G., Yan-Ling, H., Lettinga, G., and Field, J.A. (1998). "Anaerobic-aerobic treatment of toxic pulping black liquor with upfront effluent recirculation". Journal of Fermentation and Bioengineering. **86**(1): 97-110.
66. Jantsch, T.G., Angelidaki, I., Schmidt, J.E., Braña de Hvidsten, B.E., and Ahring, B.K. (2002). "Anaerobic biodegradation of spent sulphite liquor in a UASB reactor". Bioresource Technology. **84**(1): 15-20.
67. Danko, A.S., Pinheiro, F., Abreu, A.A., and Alves, M.M. (2008). "Effect of methanogenic inhibitors, inocula type, and temperature on biohydrogen production from food components". Environmental Engineering and Management Journal. **7**(5): 531-536.
68. Chidthaisong, A. and Conrad, R. (2000). "Specificity of chloroform, 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil". Soil Biology and Biochemistry. **32**(7): 977-988.
69. Asada, C., Kita, A., Sasaki, C., and Nakamura, Y. (2011). "Ethanol production from disposable aspen chopsticks using delignification pretreatments". Carbohydrate Polymers. **85**(1): 196-200.
70. Sayler, G.S., Allen, M.S., and Sanseverino, J., (2006). "Why Sequence a *Thauera* species?". Consultado em: 4 Dezembro de 2011; disponível em :<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/50002.html>



## Anexos A

**Tabela 24: Rectas calibração utilizadas como calibração para determinação dos compostos formados**

Compostos	Recta calibração	R <sup>2</sup>
Glicose	$y=3,9618E-07x-1,4994E-02$	0,9991
Xilose	$Y=4,0278E-07x +8,5425E-02$	0,9999
Ácido acético	$y=7,789E-07x+1,054E-02$	0,9999
Ácido propiónico	$y=7,4077E-07x+7,6743E-03$	0,9963
Ácido butírico	$y=5,3933E-07x+2,9098E-02$	0,9966
Ácido Láctico	$y= 6E-07x - 0,0006$	0,9995
Etanol	$y=9,3531E-07x+7,0162E-03$	0,9998

Início fermentação acidegénica



Final da fermentação acidogénica



**Figura 24: Observação mudança de cor das fracções de HSSL no final da fermentação.**



## Anexos B

**Tabela 25: Oligonucleótidos 16rRNA utilizados como sondas.**

Microorganismos	Nome sonda	Referências
Eubacteria	EUB 338	Aman RI etal 1990
<b><i>Proteobacteria:</i></b>		
$\alpha$ -proteobacteria	ALF 968	Neef,1997
$\beta$ - proteobacteria	BET42a	Manzet <i>al.</i> 1992
$\gamma$ -proteobacteria	GAM42a	Manzetal 1992

Preparação dos reagentes para a fixação das células da preparação do FISH, segundo Amann (1995)

**Important:**

The paraformaldehyde fixation is most suitable for Gram-negative cells. For samples containing Gram-positive cells please also fix sample aliquots with ethanol only.

**Paraformaldehyde fixation**

Solutions:

- 3 x PBS
- 1 x PBS
- 4% paraformaldehyde

Preparation of 4% paraformaldehyde:

- heat 33 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> to 60-65°C
- add 2 g paraformaldehyde while stirring
- add 10 N NaOH drop-wise until paraformaldehyde is solved completely
- add 16.5 ml 3x PBS buffer
- adjust the pH to 7.2-7.4 at 20°C
- filter through 0.45 µm filter
- use within 24 h, store on ice until use

Fixation:

- harvest cells by centrifugation
- wash the pellet with 1x PBS, centrifuge again and resuspend pellet in an appropriate volume of fresh 1x PBS
- add 3 volumes of fresh paraformaldehyde solution
- incubate for 3 h or over night at 4°C
- spin down the cells (5 min)
- discard supernatant
- wash the pellet with 1x PBS, centrifuge again
- resuspend the pellet in fresh 1x PBS
- add 1 volume of ice-cold EtOH<sub>abs.</sub>
- store at -20°C

**Ethanol fixation**

- harvest cells by centrifugation
- wash the pellet with 1x PBS, centrifuge again
- resuspend the pellet in an appropriate volume of fresh 1x PBS
- add 1 volume of ice-cold EtOH<sub>abs.</sub>
- store at -20°C

#### **Standard protocol for hybridization on slides**

- prepare specimen on a teflon coated slide: spot fixed cells (2-15  $\mu$ l, amount depending on the cell concentration) and dry for about 10 min at 46°C
- in the meantime, prepare the hybridization buffer and keep at room temperature
- dehydrate specimen on the slide in an increasing ethanol series (3 min each in 50, 80 and 100 % ethanol)
- in the meantime, thaw the oligonucleotide probes
- drop 10  $\mu$ l of hybridization buffer onto the wells
- add 1  $\mu$ l of each probe (working solution, concentration 30 ng/ $\mu$ l for Cy3 and Cy5 labeled probes, or 50 ng/ $\mu$ l for FLUOS labeled probes) without scratching the teflon surface
- prepare a hybridization tube (50 ml Falcon tube) by folding a piece of tissue, putting it into the tube and pouring the rest of the hybridization buffer onto the tissue
- immediately transfer the slide into the hybridization tube and incubate in the hybridization oven (46°C) for 1.5 hours
- in the meantime, prepare the washing buffer and preheat this buffer at 48°C (water bath)
- rinse the hybridization buffer with the washing buffer from the slide and incubate the slide in the washing buffer for 10 min in a preheated water bath (48°C)
- remove the washing buffer with distilled water (do not detach the cells!) and dry the slide quickly (compressed air).
- embed the slide with embedding liquid (Citifluor or Vectoshield) and put a cover slip onto the slide. Painting the cover slip externally (e.g. nail paint) and keeping the slides at -20 °C, allow good microscopic observations for long time (even months)

**Hybridization buffer for *in situ* hybridization at 46°C**

Pipet into a 2 ml Eppendorf reaction tube:

- 5 M NaCl                      360 µl
- 1 M Tris/HCl pH 8,0      40 µl
- add formamide and MQ (ultra pure water), depending on the applied stringency:

% Formamide (v/v)	Formamide [µl]	MQ [µl]
0	0	1.600
5	100	1.500
10	200	1.400
15	300	1.300
20	400	1.200
25	500	1.100
30	600	1.000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1.000	600
60	1.100	500
65	1.200	400
70	1.300	300

- 10 % (w/v) SDS            4 µl

### Washing buffer for *in situ* hybridization at 46°C

Mix in a 50 ml Falcon tube:

- 1 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0
- 5 M NaCl and 0,5 M EDTA pH 8, 0 according to the following table:

% Formamide in hybridization buffer	[NaCl] in mol/l	NaCl [ $\mu$ l]
0	0,900	9.000
5	0,636	6.300
10	0,450	4.500
15	0,318	3.180
20	0,225	2.150
25	0,159	1.490
30	0,112	1.020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,008	40
70	0,000	no NaCl, only 350 $\mu$ l EDTA

- for formamide concentrations of 20% and higher in the hybridization buffer add 500  $\mu$ l 0.5 M EDTA
- 50  $\mu$ l 10 % (w/v) SDS
- preheat the washing buffer at 48°C prior to use

### Gelatine coating

- Clean the slides in a solution of ethanolic KOH (10% KOH in 95% EtOH) for 1 hour.
- Air dry.
- Dip the slides into a gelatine solution (0.075% gelatine, 0.01% chromium potassium sulfate dodecahydrate) at 70°C.
- Air dry in a vertical position.

### Poly-L-lysine coating

- Clean slides in alcohol (1% HCl in 70% EtOH).
- Allow diluted poly-L-lysine (0.01%, Sigma) to come to room temperature (100 ml in coplin jars).
- Place slides in the coplin jar for 5 min.
- Drain slides and dry for 1 hour at 60°C or over night at room temperature.

### Reference

Amann, R. I. (1995). *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, pp. MMEM-3.3.6/1–MMEM-3.3.6/15. Edited by A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas & F. J. de Bruijn. London: Kluwer.